

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Evaluación de la protección conferida por un
programa de vacunación contra la enfermedad de
Gumboro en pollos de carne aplicando la fórmula
Deventer**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Walter Mitchell Paredes Vásquez

Lima – Perú

2006

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	x
SUMMARY	xi
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
 I. INTRODUCCIÓN	 1
 II. REVISIÓN DE LITERATURA	 3
1. SISTEMA INMUNE AVIAR	3
2. BOLSA DE FABRICIO	4
3. ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BOLSA	5
4. ETIOLOGIA	6
4.1 Estructura del virus	6
4.2 Proteínas virales	7
4.3 Replicación viral.....	8
4.4 Resistencia a agentes físicos y químicos.....	8
4.5 Serotipos	8
5. INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN	9
6. TRANSMISIÓN.....	9
7. PATOGENIA.....	10
8. CUADRO CLÍNICO.....	10
8.1 Forma subclínica.....	10
8.2 Forma clínica.....	11
9. CUADRO LESIONAL.....	11
9.1 Lesiones macroscópicas.....	11
9.2 Lesiones microscópicas	12
10. INMUNOSUPRESION E INTERACCION CON OTROS AGENTES.....	12
11. DIAGNOSTICO.....	13
12. PREVENCIÓN Y CONTROL	15

12.1 Vacunas vivas	15
12.2 Vacunas inactivadas.....	16
12.3 Programas de vacunación	16
13. FORMULA DEVENTER.....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
1. MATERIALES	20
1.1 Animales	20
1.2 Vacunas	20
1.3 Cepa de desafío.....	21
2. MÉTODOS.....	22
2.1 Lugar de estudio	22
2.2 Tamaño muestral	23
2.3 Diseño experimental	23
2.4 Manejo de los animales	25
2.5 Desafío experimental	25
2.6 Parámetros de evaluación	25
2.6.1 Signos clínicos	25
2.6.2 Lesiones macroscópicas.....	26
2.6.3 Índice bursal.....	26
2.6.4 Lesiones microscópicas	26
2.6.5 Evaluación la respuesta serológica.....	27
2.6.6 Medición de parámetros productivos	28
2.7 Análisis Estadístico	29
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	47
VII. LITERATURA CITADA.....	48
VIII. APÉNDICE	

RESUMEN

El presente estudio evaluó la protección conferida por un programa de vacunación a la edad determinada por la fórmula Deventer frente a un desafío con una cepa estándar del virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (EIB) en pollos de carne. Se formaron tres grupos experimentales. El grupo A vacunado a los 10 días de edad con la una cepa Lukert (intermedia-suave) y a los 18 días con la cepa CE (intermedia-intermedia); el grupo B vacunado a los 21 días de edad (según la fórmula Deventer) con la cepa 228TC (intermedia-intermedia) y el grupo C no fue vacunado (control). A los 35 días de edad 45 aves de cada grupo fueron desafiados con la cepa estándar F 52/70 del virus de la EIB. La protección fue medida a través de la sintomatología clínica, índice bursal (I.B.), lesiones macroscópicas y microscópicas, serología y parámetros productivos después del desafío. Todos los grupos presentaron sintomatología clínica y edema bursal hasta el día 10 post desafío. Los valores de I.B. en los tres grupos fueron compatibles con atrofia bursal y las lesiones histopatológicas fueron severas en los grupos vacunados. No se observó seroconversión a EIB hasta el final del estudio y los parámetros productivos de los grupos vacunados fueron similares ($p>0.05$). Los resultados obtenidos indicaron que ninguno de los grupos fue protegido de la enfermedad clínica hasta los 10 días post desafío, sin embargo los parámetros productivos en los grupos vacunados no se vieron afectados por la cepa de desafío. La mejor protección se observó en el grupo A en comparación al grupo B sin embargo no se observó diferencia estadística significativa ($p>0.05$).

Palabras clave: Enfermedad infecciosa de la bursa (EIB), vacunación, fórmula Deventer, protección.

SUMMARY

The present study evaluated the conferred protection by a program of vaccination to the age determined by the Deventer formula against a challenge with a standard strain of the Infectious Bursal Disease virus (IBDV) in broiler chickens. There were three experimental groups. The group A was vaccinated at 10 days old with a Lukert strain (intermediate-mild) and 18 days with CE strain (intermediate-intermediate); group B vaccinated at 21 days old (according to the Deventer formula) with the 228TC strain (intermediate-intermediate) and group C were not vaccinated (control). At 35 days old 45 birds of each group were challenged with a standard strain F 52/70 of the IBDV. The protection was measured through clinical signs, bursal index (B.I.), gross and microscopic lesions, serology and productive parameters after challenge. All the groups presented clinical signs and bursal oedema until 10 days post challenge. The values of I.B. in the three groups were compatible with bursal atrophy and the histopathology lesions were severe in the vaccinated groups. Seroconversion was not observed until the end of the study and productive parameters of the vaccinated groups were similar ($p>0.05$). The obtained results indicated that no one of the experimental groups was protected of the clinical disease until the 10 days post challenge; nevertheless productive parameters in the vaccinated groups were not affected by challenge. The best protection was observed in the group A in comparison group B nevertheless was not observed significant statistical difference ($p>0.05$).

Key words: Infectious bursal disease virus (IBDV) , vaccination, Deventer formula, protection.

LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Porcentaje de aves con depresión desafiadas con la cepa F52/70	31
Cuadro 2. Porcentaje de aves con diarrea desafiadas con la cepa F52/70	31
Cuadro 3. Severidad de diarrea (promedio) de ves desafiadas con la cepa F52/70	32
Cuadro 4. Porcentaje (%) de aves con edema en bursa desafiadas con la cepa F52/70	33
Cuadro 5. Valores de Índice bursal promedio en aves desafiadas con 34la cepa F 52/70	34
Cuadro 6. Aves con atrofia bursal (%) en grupos de aves desafiadas con la cepa F52/70 a los 35 días de edad.	34
Cuadro 7. Calificación promedio de lesiones histopatológicas en bursa de aves desafiadas con la cepa F 52/70.	35
Cuadro 8. Títulos de anticuerpos (PGT) por ELISA en aves desafiadas con la cepa F52/70	36
Cuadro 9. Peso corporal (g) promedio semanal.	38
Cuadro 10. Parámetros productivos de aves desafiadas al final de campaña (45 días de edad)	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Títulos de anticuerpos (PGT) por ELISA en aves desafiadas con la cepa F52/70 a los 35 días de edad	31
--	----

I. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Infecciosa de la Bursa (EIB) o Enfermedad de Gumboro es una enfermedad viral altamente contagiosa y aguda que afecta principalmente a pollos jóvenes, y se caracteriza por un daño masivo en la bolsa de Fabricio y una severa inmunosupresión (Kulíková *et al.*, 2004). La EIB es una enfermedad de gran importancia en la industria avícola mundial por causar grandes pérdidas por la elevada mortalidad, el retraso en el crecimiento, condena de carcasas, fallas en los programas de vacunación y el incremento de la susceptibilidad a otras infecciones debido a la inmunosupresión (Phong *et al.*, 2003; Genova, 2000).

La EIB fue reconocida por primera vez por Cosgrove en 1962 en las cercanías de Gumboro, Delaware, Estados Unidos. En el Perú se le conoce desde el año 1969 cuando se describieron los primeros casos (Castro-Pozo, 1994). El virus de la EIB posee un genoma ARN de doble cadena bisegmentado y pertenece al género *Avibirnavirus*. El órgano blanco del virus es la bolsa de Fabricio y afecta a las células B inmaduras, lo que da como

consecuencia variados grados de inmunosupresión. De acuerdo a la edad de infección, esta puede ser subclínica cuando el virus infecta aves menores de tres semanas, o presentarse como enfermedad clínica cuando el virus infecta aves entre 21 a 65 días de edad (Saif, 2003). La infección subclínica se caracteriza por una inflamación de la bolsa de Fabricio durante la fase aguda (3-4 días) y posteriormente una severa atrofia del órgano, lo que provoca un estado de inmunosupresión permanente en las aves, reflejada en retraso del crecimiento, la elevada incidencia de fallas en la vacunación contra otras enfermedades y el incremento de la susceptibilidad a infecciones secundarias (Villegas y Banda, 2001).

La prevención y el control de la EIB incluyen un programa eficaz de bioseguridad y la vacunación de los lotes de reproductoras y su progenie. En la actualidad, se dispone en el mercado de vacunas vivas e inactivadas de variada virulencia. En pollos de carne la elección del tipo de vacuna a ser aplicada depende de los niveles de anticuerpos del lote a ser vacunado y la naturaleza del virus de campo (Saif, 2003). Debido a que los anticuerpos maternos tienden a disminuir con la edad, es indispensable determinar la edad óptima de vacunación para proveer a las aves una adecuada protección. Para ello existen fórmulas matemáticas que ayudan a predecir el momento en el que los niveles de anticuerpos maternos serán los suficientemente bajos para una vacunación adecuada (de Witt, 2001).

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar la protección conferida después del desafío con una cepa estándar del virus de la EIB en pollos de carne vacunados contra la enfermedad de Gumboro, asimismo evaluar el efecto patógeno de las vacunas empleadas en dos programas de vacunación contra la enfermedad de Gumboro teniendo en cuenta dos criterios: Vacunando una sola vez a la edad determinada por la fórmula Deventer o vacunando a las aves con dos vacunas vivas aplicadas a las 10 y 18 días de edad como comúnmente se usa en campo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. SISTEMA INMUNE AVIAR

El sistema inmune de las aves al igual que en los mamíferos, consta de dos mecanismos de defensa inmunológica: la inmunidad innata o natural y la inmunidad adquirida. La inmunidad natural incluye barreras anatómicas (piel, membranas mucosas, cilios traqueales), barreras fisiológicas (fiebre, enzimas en fluidos corporales, pH del proventrículo), células de la respuesta inflamatoria y el sistema de complemento. La inmunidad adquirida incluye los mecanismos de respuesta celular y humoral dependiente de los órganos linfoides del sistema inmune (Hoerr, 2002).

Todas las especies aviares presentan dos órganos linfoides primarios donde se produce la maduración y diferenciación linfocitaria independiente de antígenos: la bolsa de Fabricio y el timo (Calier, 2002). Los linfocitos que se originan en la médula ósea son transportados vía sanguínea a los órganos linfoides primarios donde ocurre la maduración de linfocitos B y T en la bolsa de Fabricio y timo respectivamente. Los linfocitos maduros abandonan los órganos linfoides primarios y migran a los órganos linfoides secundarios, que incluyen el bazo, glándula de Harder, tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) y tejido linfoide asociado al intestino (GALT) el cual incluye las placas de Peyer, tonsilas cecales y agregados de células intraepiteliales localizados a lo largo de tracto intestinal (Contreras, 2003).

Las aves poseen tres clases principales de inmunoglobulinas: Ig M, Ig Y e Ig A, la presencia de Ig D e Ig E también han sido descritas pero aún no han sido

demostradas (Carlander, 2004). La Ig M se forma durante la respuesta inmune primaria y se encuentra en el líquido amniótico del huevo y en pollitos de un día de edad. La Ig Y del ave es el equivalente funcional de la Ig G de los mamíferos y aparece conforme avanza la respuesta inmune. La Ig A se encuentra en secreciones del tracto respiratorio y gastrointestinal, y es responsable de la protección de estas mucosas (Tizard, 1998).

2. BOLSA DE FABRICIO

La bolsa de Fabricio (BF) es un órgano linfoepitelial presente sólo en aves y fue descubierta por Hyeronimus Fabricius en el año 1621 (Alzola, 2002). El primer esbozo de este órgano aparece al cuarto día de incubación en la unión del ectodermo y endodermo, y presenta una estructura redonda en forma de saco ubicada en posición dorsal a la cloaca (Alzola, 2002; Tizard, 1998). Al igual que el timo, la BF alcanza su mayor tamaño en el pollo pocas semanas posteriores a la eclosión y luego con la madurez sexual involucre de manera gradual hasta desaparecer o quedar reducida a simples vestigios (Tizard, 1998; King, 2000).

La BF está formada de células linfoides “empotradas” en el tejido epitelial, el cual reviste la superficie interna del órgano. En el interior se extienden de 12 a 14 pliegues longitudinales que se orientan hacia el lumen y están revestidos por un epitelio columnar pseudoestratificado o columnar. En cada pliegue se encuentran dispersos folículos linfoides divididos por trabéculas de tejido conjuntivo (Banks, 1995; Tizard, 1998; King, 2000).

Cada folículo linfoide se divide en corteza y médula. La corteza contiene linfocitos, plasmocitos y macrófagos. En la unión córticomedular existe una membrana basal y una red capilar dentro de la cual hay células epiteliales. Estas células epiteliales medulares son reemplazadas por fibroblastos y linfocitos en el centro del folículo (Tizard, 1998). La población linfoide de cada folículo está conformada por un 85 a 95% de linfocitos B y un 4% de linfocitos T (Kim *et al.*, 2000).

La BF es un órgano linfoide primario cuya función es servir de sitio de maduración y diferenciación a las células productoras de anticuerpos

(Linfocitos B). En la BF se realiza un proceso de selección de células B. Aquellas células B autorreactivas son eliminadas mediante apoptosis (selección negativa) y aquellas células B sobrevivientes son estimuladas a proliferar (selección positiva) para posteriormente migrar a los órganos secundarios (Tizard, 1998).

3. ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BOLSA

La EIB o enfermedad de Gumboro apareció por primera vez en 1957 cerca al pueblo de Gumboro, al sur de Delaware en los Estados Unidos, y fue reportada por Cosgrove en 1962. (Salem *et al.*, 2003). A esta nueva entidad patológica se le conoció como *nefrosis aviar* debido al severo daño renal encontrado en los pollos que murieron por la infección (Lukert y Saif, 2003). Este hallazgo con frecuencia era acompañado con un notable crecimiento de la bolsa de Fabricio (Lunger y Maddux, 1972). En 1962 Winterfield y Hitchner aislaron el agente causal de un síndrome similar a la *nefrosis aviar* pero hoy se sabe que estaba relacionado a un virus de bronquitis infecciosa con tropismo renal. Poco después Winterfield y Hitchner aislaron otro agente causante de las lesiones exclusivas en la bolsa de Fabricio, al cual denominaron *agente infeccioso bursal* (Lunger y Maddux, 1972). Posteriormente, en 1970, Hitchner propuso el término de enfermedad infecciosa de la bolsa (Lukert y Saif, 2003).

En 1980 se reportó la existencia de un segundo serotipo del virus de la EIB, aislado en pavos, sin embargo mostró no ser patogénico ni en pavos ni en pollos (Jackwood *et al.*, 1982; Phong *et al.*, 2003).

Durante 1984 a 1985 cepas variantes del serotipo 1 se aislaron en la península de Delmarva (Estados Unidos). Dichas cepas resultaron ser antigénicamente diferentes a las inicialmente identificadas conocidas como cepas clásicas o estándar (Villegas y Banda, 2001).

Poco después, en 1987, surgió en Europa una nueva forma de la EIB conocida como muy virulenta o vvIBD (very virulent infectious bursal disease). Estas cepas altamente patogénicas fueron reportadas en lotes de pollos con elevados niveles de anticuerpos maternos, causando una elevada mortalidad

(60% -100%) y con lesiones típicas de la forma clásica de la EIB (Gardin, 2003; Abdel-Alim *et al.*, 2003).

Posteriormente, desde la emergencia de virus muy virulentos a la actualidad, se ha reportado su presencia en varios países de Europa, África, Medio Oriente, Asia y Latinoamérica (Zorman-Rojs *et al.*, 2003). En 1997 llegó al continente americano comenzando por Brasil, República Dominicana y en el 2001 se reportó en Venezuela (Banda y Villegas, 2004).

En todos los países afectados, esta nueva situación ha llevado a los veterinarios a reconocer la concepción de la enfermedad y revisar su enfoque profiláctico. Desafortunadamente, el virus de la EIB puede desarrollar gran variabilidad genética, lo que ocasiona la presencia de virus con características antigénicas diversas en el campo (Gardin, 2003; Banda y Villegas, 2001).

4. ETIOLOGÍA

El virus de la EIB pertenece al género *Avibirnavirus* en la familia Birnaviridae. Otros miembros de esta familia incluyen al virus de la necrosis pancreática infecciosa, que infecta peces y moluscos bivalvos, y al virus X *Drosophila* de la mosca de la fruta (Lukert y Saif, 2003).

4.1 Estructura del virus

Es un virus no envuelto, de simetría icosaédrica de 55 a 60 nm de diámetro con una cápside simple compuesta por 92 capsómeros y posee un genoma con doble cadena de ARN dividida en dos segmentos (Hirai y Shimakura, 1974; Müller *et al.*, 1979; Pereira *et al.*, 1998). El segmento más largo, denominado A, tiene una longitud de 3400 pares de bases y un peso molecular de 2.066×10^6 kDa. El segmento mas pequeño, denominado B, tiene una longitud de 2900 pares de bases y un peso molecular de $1,76 \times 10^6$ kDa (Sellers *et al.*, 2001).

4.2 Proteínas virales

Se han reconocido cinco proteínas virales (VP) designadas como VP1, VP2, VP3, VP4 y VP5, cuyos pesos moleculares aproximados son 90 kDa, 41 kDa, 32 kDa, 28 kDa y 17 kDa respectivamente. Se han observado otras proteínas

como la VPX que tiene un peso molecular de 48 kDa (Lukert y Saif, 2003; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000).

El segmento B codifica la VP1 que constituye el 3% de las proteínas virales y es una ARN polimerasa dependiente del ARN viral (Lukert y Saif, 2003; von Einem *et al.*, 2004).

El segmento A codifica las demás proteínas virales. La VP2 y VP3 constituyen el 51% y 40% de las proteínas virales respectivamente y son consideradas las proteínas estructurales principales del virus y han sido identificadas como los mayores determinantes antigénicos. La VP2 es la proteína de mayor importancia inmunogénica porque induce la formación de anticuerpos neutralizantes y además posee variaciones en la secuencia de aminoácidos en su región hipervariable que es la responsable de las diferencias en antigenicidad y patogenicidad de las cepas y serotipos existentes (Sellers *et al.*, 1999; Banda *et al.*, 2003; Sellers *et al.*, 2001; Majó *et al.*, 2002; Phong *et al.*, 2003). La VP3 es un antígeno específico de grupo común a ambos serotipos e interactúa con la VP1 y el ARN viral, formando complejos que tendrían un rol esencial en la morfogénesis de partículas virales durante la replicación (Brandt *et al.*, 2001, Tacken *et al.*, 2002a). La VP4, que constituye un 6% de las proteínas virales, es una proteasa viral y es responsable del procesamiento de una poliproteína precursora (Lukert y Saif, 2003; Mittal *et al.*, 2005). La VP5 es un polipéptido no estructural que induce lisis celular y cumple un rol importante en la liberación de la progenie viral. La expresión de VP5 en la célula induce la alteración de la morfología celular, disrupción de la membrana plasmática y una severa reducción de la viabilidad celular (Lombardo *et al.*, 2000).

4.3 Replicación viral

En general, se conoce poco acerca de los eventos bioquímicos vinculados con la replicación viral de los birnavirus. El mecanismo de la síntesis de ARN no se ha determinado con claridad aunque se ha demostrado que el virus replica su ácido nucleico mediante un mecanismo de desplazamiento de filamento. La transcripción y replicación se produce luego de la penetración

celular sin desnudamiento total del virus (Lukert y Saif, 2003). Tacken *et al.* (2002b) describen la formación de complejos VP1-VP3 en el citoplasma de células infectadas y que eventualmente se liberaron en el cultivo celular, sugiriendo que la polimerasa viral (VP1) se incorpora en los viriones mediante interacciones con la proteína de la cápside interna (VP3). Lombardo *et al.* (2000) mostraron que la VP5 se acumula dentro de la célula huésped e induce lisis celular, permitiendo la liberación de los viriones. Chevalier *et al.* (2005) demostraron que el pep 46 (un polipéptido estructural en la VP2) está involucrado en la adherencia del virus y la penetración celular.

4.4 Resistencia a agentes físicos y químicos

El virus de la EIB es muy estable y puede permanecer en alojamientos aviares aún después de la limpieza y desinfección. Es resistente al éter y cloroformo, se inactiva a pH 12 pero no se afecta por el pH 2 y sobrevive a 60 °C, pero no a 70 °C por 30 minutos. Su infectividad se reduce a la exposición con formalina al 0,5% por 6 horas (Lukert y Saif, 2003). Por otro lado, el virus puede permanecer viable en un local alrededor de 120 días luego de retirar aves afectadas y se ha demostrado que el virus aún sobrevive en el agua, alimento y heces obtenidas de granjas afectadas luego de 50 días (Villegas y Banda, 2001).

4.5 Serotipos

Existen dos serotipos del virus: 1 y 2. Las cepas del serotipo 1 son patogénicas en pollos y varían en virulencia, mientras que las cepas del serotipo 2, aisladas en pavos, no son patogénicas ni en pollos ni pavos. De acuerdo a su virulencia y variación antigénica las cepas del serotipo 1 pueden ser clasificadas en cuatro grupos: virulentas clásicas, atenuadas, variantes antigénicas y muy virulentas (vvIBDV) (Xue y Lim, 2001). Mediante la técnica de neutralización viral se han identificado 6 subtipos antigénicos del serotipo 1 (Jackwood y Jackwood, 1997; Dybing y Jackwood, 1996).

5. INCIDENCIA Y DISTRIBUCIÓN

El virus de la EIB es de distribución mundial y tiene una elevada incidencia en las grandes zonas de producción avícola (Lukert y Saif, 2003). La Oficina

Internacional de Epizootias (OIE) estima que la EIB está presente en más del 95% de los países miembros. Se ha identificado la presencia de cepas variantes en la mayor parte de Estados Unidos, así como en Canadá, Australia, Centroamérica y Sudamérica. La presencia de cepas muy virulentas se ha observado en Europa, Asia, África, Sudamérica y Centroamérica, no se tiene reporte de estas cepas en Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda (Jackwood, 2001). En el Perú sólo se ha reportado la presencia de cepas clásicas y variantes del tipo Delaware (Icochea *et al.*, 2002).

6. TRANSMISIÓN

La transmisión es vía oral, el virus se transmite rápidamente de un animal a otro por contacto directo o a través de vectores inanimados, agua o alimento que ha sido contaminado con heces infectadas (los pollos infectados excretan el virus luego de dos semanas post infección). El hombre, aves silvestres también pueden servir como vectores, así como ratas, mosquitos (*Aedes vexans*) y la larva del escarabajo coprófago *Alphitobius diaperinus*. No hay evidencia de transmisión a través del huevo ni que aves recuperadas sean portadoras del virus (Lukert y Saif, 2003; Ceva, 2002). Recientemente Torrents *et al.* (2004) describen a los perros como potenciales portadores del virus, al haber obtenido virus viables y con capacidad infectiva en las heces de perros infectados de manera experimental.

7. PATOGENIA

La principal vía de infección es la oral a través de la ingestión de heces o material orgánico contaminado. Utilizando la técnica de inmunofluorescencia se observó que el virus se replica inicialmente en macrófagos y células linfoides del tracto gastrointestinal (duodeno, yeyuno y tonsilas cecales) pasando luego a la circulación portal. El virus llega al hígado 5 horas post infección donde las células de Kupffer fagocitan una cantidad considerable del virus y se produce una primera viremia que permite al virus diseminarse a través del organismo a los órganos linfoides, particularmente a la bolsa de Fabricio, donde se produce una masiva multiplicación del virus en los linfocitos B inmaduros. A las 16 horas post infección se produce una segunda viremia que resulta en una replicación

viral secundaria en otros órganos linfoides como bazo, timo, tonsilas cecales y también en otros órganos como hígado y riñones. La enfermedad clínica y muerte ocurren de 64 a 72 horas post infección (Lukert y Saif, 2003; Lima *et al.*, 2002; Intervet, 2004). Existen evidencias que el virus tiene predilección por las células B inmaduras y mas específicamente en los linfocitos B que presentan moléculas de IgM, además parece no tener habilidad para multiplicarse en los linfocitos T ni en los linfocitos B periféricos (Sivanandan y Maheswaran, 1980; Hirai y Calnek, 1979). Se ha observado que en la médula ósea se produce una lisis selectiva de los mielocitos heterófilos en etapas tempranas de la infección e independientemente de la replicación viral (Inoue *et al.*, 1999).

8. CUADRO CLÍNICO

La EIB se presenta bajo dos formas dependiendo de la edad al momento de la infección, la virulencia de la cepa viral y el grado de inmunidad de las aves afectadas (Villegas y Banda, 2001). El período de incubación es muy breve y los signos clínicos dependen de la forma de presentación de la enfermedad; generalmente se manifiestan 2 a 3 días posteriores a la exposición (Lukert y Saif, 2003).

8.1 Forma subclínica

La forma subclínica es producida por cepas variantes en aves menores de 3 semanas de edad y cursa con un cuadro clínico asintomático, aunque las aves evidencian crecimiento retardado, fallas en los programas de vacunación contra otras enfermedades y aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias debido al cuadro de inmunosupresión que presentan las aves, en las que se observa una inflamación inicial de la bolsa de Fabricio y posteriormente una rápida atrofia de la misma. Las infecciones con cepas clásicas de menor virulencia pueden originar también la forma subclínica, especialmente cuando las aves se infectan a temprana edad. Se han descrito brotes donde únicamente se observa disminución en la ganancia de peso, o inclusive puede ocurrir la producción de anticuerpos sin la aparición de signos clínicos (Banda y Villegas, 2001; Villegas y Banda, 2001; Ceva, 2002)

8.2 Forma clínica

La forma clínica o aguda es producida por cepas clásicas incluyendo las de alta virulencia, afectando aves entre 3 y 6 semanas de edad. Usualmente el primer signo evidente es el picaje de las aves de su propia cloaca, posteriormente se presenta diarrea acuosa y blanquecina, anorexia, depresión y plumas erizadas. Los animales más susceptibles muestran postración severa, cabeza caída, deshidratación severa, hipotermia y mueren en pocos días. Las aves que sobreviven se recuperan rápidamente. La morbilidad puede alcanzar el 100% y la mortalidad puede sobrepasar el 50% (Banda y Villegas, 2001; Villegas y Banda, 2001; Ceva, 2002).

9. CUADRO LESIONAL

9.1 Lesiones macroscópicas

Las lesiones características de la EIB se observan principalmente en la bolsa de Fabricio y difícilmente se confunden con otras enfermedades, excepto cuando hay interacciones con otros agentes infecciosos (Cardoso y Morales, 2004). Entre el segundo y tercer día post infección la bolsa incrementa su peso y tamaño hasta en dos veces más de lo normal como resultado del edema e hiperemia y en la superficie serosa de la bolsa se exhibe un trasudado amarillento gelatinoso. Lesiones hemorrágicas (petequias y equimosis) y áreas de necrosis se observan en los casos más severos. A los 5 días post infección la bolsa regresa su tamaño normal y alrededor del día 8 post infección se inicia una rápida atrofia (Lukert y Saif, 2003; Ceva, 2002). Otros órganos linfoides secundarios como el timo y el bazo se afectan en menor grado y se recuperan una vez pasada la infección. Las hemorragias pueden estar presentes en los muslos y músculos pectorales, debido a que el virus de la EIB interfiere con el mecanismo normal de coagulación. En aves que mueren o en etapas avanzadas de la enfermedad los riñones pueden presentar lesiones, las cuales son el resultado de la severa deshidratación y no por daño directo del virus al riñón (Butcher y Miles, 1995; Talavera, 1994).

9.2 Lesiones microscópicas

Las lesiones histológicas características se encuentran principalmente en la bolsa de Fabricio (Lukert y Saif, 2003). Dentro de las 24 a 36 horas post

infección se observa necrosis asociada con cariorrexis y picnosis de los linfocitos de la zona medular y posteriormente en la zona cortical del folículo. A las 48 horas la disminución en el número de linfocitos es notoria (depleción linfoide) y se inicia una reacción inflamatoria con presencia de hiperemia, edema interfolicular e infiltración de heterófilos, macrófagos y células plasmáticas, lo cual explica el incremento de tamaño de la bolsa durante los primeros días de la infección (Pope, 1996, Ceva, 2002). En las lesiones más severas se presentan cavidades quísticas intrafoliculares en reemplazo de las células linfoides que han sufrido el proceso de lisis; también se observa infiltración de tejido conectivo e hiperplasia del epitelio superficial (Talavera, 1994). En los órganos linfoides secundarios como el bazo, timo, glándula de Harder y tonsilas cecales también se observa necrosis y depleción linfoide aunque en menor grado y con una rápida recuperación (Ceva, 2002). Las cepas variantes inducen una rápida atrofia de la bolsa sin observación de cambios inflamatorios (Butcher y Miles, 1995).

10. INMUNOSUPRESIÓN E INTERACCIÓN CON OTROS AGENTES

La EIB representa un serio problema para la avicultura comercial debido a que cursa con cuadros de inmunosupresión transitoria o permanente que interfieren con una adecuada respuesta inmune inducida por los programas de vacunación, así como la inadecuada respuesta a infecciones de las que normalmente aves sanas se recuperan fácilmente (Gay *et al.*, 2002).

La inmunodepresión ocasionada por el virus de la EIB se debe a la destrucción de linfocitos B y sus precursores que presentan proliferación activa en la bolsa de Fabricio. Existe evidencia que el virus puede inducir una profunda disminución en los linfocitos B que presentan en su membrana moléculas de IgM y que además altera la función de las células T cooperadoras (Villegas y Banda, 2001).

La consecuencia primaria de la inmunosupresión es la elevada incidencia de fallas en los programas de vacunación contra la enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa o enfermedad de Marek. Posteriormente las aves presentan un incremento en la susceptibilidad a algunas enfermedades

infecciosas como enfermedad respiratoria crónica complicada, hepatitis con cuerpos de inclusión, laringotraqueítis infecciosa aviar, anemia infecciosa aviar e infecciones por reovirus. También incrementa la susceptibilidad a *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e infecciones por *Eimeria* sp. (Ceva, 2002). Se ha reportado que el virus suprime la función de los macrófagos, lo cual explicaría el incremento de infecciones bacterianas secundarias (Genova, 2000).

11. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la EIB involucra la observación del cuadro clínico (en aves mayores de 3 semanas) y la identificación de lesiones características durante la necropsia además de la evaluación histopatológica de la bolsa de Fabricio. La confirmación del diagnóstico requiere pruebas de laboratorio que incluyen aislamiento viral, detección de antígenos en tejidos, análisis serológicos y pruebas moleculares (Banda y Villegas, 2001).

El aislamiento del virus puede realizarse mediante la inoculación de material sospechoso (bursa o bazo) en huevos embrionados, cultivos celulares y aves libres de patógenos específicos (SPF). En huevos embrionados se realiza vía saco vitelino en embriones de 6 a 8 días o vía membrana corioalantoidea en embriones de 9 a 11 días. La muerte embrionaria ocurre entre 3 a 5 días y se observan lesiones que incluyen edema y hemorragias subcutáneas, hemorragias intracraneales, necrosis hepática y esplenomegalia (OIE, 2004). Los cultivos celulares se realizan comúnmente en fibroblastos y células renales de embrión de pollo, células vero entre otras líneas celulares de mamíferos, se usan solo para cepas adaptadas y no sirven para aislamientos iniciales (Ahasan *et al.*, 2002)

Las técnicas directas e indirectas de anticuerpos fluorescentes así como las pruebas de inmunoperoxidasa han demostrado ser muy confiables para detectar antígenos virales presentes en cultivos celulares, improntas o cortes de tejidos de aves infectadas (Banda y Villegas, 2001; Perera *et al.*, 2002).

Las pruebas serológicas son las técnicas más utilizadas en el diagnóstico de la EIB, estas pruebas incluyen hemaglutinación indirecta, precipitación en agar gel, inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA), inmunofluorescencia, seroneutralización e inmunoelectroforesis (Hussain *et al.*, 2003; Mittal *et al.*, 2005). La prueba de seroneutralización es la técnica más sensible para la detección de anticuerpos contra el virus de la EIB. La prueba de ELISA es la más usada porque posee las ventajas de ser rápida, económica y puede analizar gran número de muestras a la vez, además puede ser adaptada a programas de computación que facilitan la interpretación de los resultados (Lukert y Saif, 2003; Jackwood *et al.*, 1999).

El uso de técnicas de detección y tipificación molecular han cobrado importancia debido a su gran sensibilidad y a la gran variabilidad genética que presenta el virus. La transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) sintetiza ADN a partir de ARN viral y permite identificar rápidamente al virus. Esta técnica es altamente sensible y se puede realizar en tejidos frescos, refrigerados, congelados o preservados en fenol. El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) permite genotipificar las diferentes cepas virales (vacunales o de campo) a partir del ADN obtenido en la RT-PCR (Banda y Villegas, 2001; Banda *et al.*, 2003, Jackwood *et al.*, 2001). Recientemente una nueva técnica molecular denominada análisis de la movilidad de heteroduplos (HMA) compara dos productos obtenidos mediante RT-PCR y permite identificar diferencias mínimas entre cepas del mismo tipo (Banda *et al.*, 2004).

12. PREVENCIÓN Y CONTROL

El control y prevención de la EIB incluye un programa eficaz de bioseguridad así como programas efectivos de vacunación (Butcher y Miles, 1995). La bioseguridad es una importante medida de prevención, desafortunadamente la gran viabilidad del virus conduce a la persistencia del virus en el ambiente. El control de la EIB se basa principalmente en la vacunación de reproductoras y su progenie. Para ello se dispone de vacunas vivas de virulencia variada y vacunas inactivadas o muertas (Al-Natour *et al.*, 2004; Kulíková *et al.*, 2004).

12.1 Vacunas vivas

Las vacunas vivas son clasificadas como: virulentas, intermedias y suaves de acuerdo a su patogenicidad (capacidad para inducir daño en la bursa de aves libres de patógenos) y con ello su capacidad de infectar en presencia de niveles altos, medios o bajos de anticuerpos maternos. Las vacunas virulentas actualmente están fuera del mercado (Morales, 1993). Las vacunas llamadas “Intermedias” son actualmente las más populares y utilizadas. Estas pueden ser usadas en pollos en presencia de inmunidad materna, ya que estas cepas son capaces de superar inmunidad materna a diferentes niveles a diferencia de las vacunas suaves (Toscano *et al.*, 2002). Las vacunas intermedias a su vez se clasifican en tres grupos dependiendo de su habilidad en atravesar la inmunidad materna: intermedias-suaves son cepas altamente atenuadas, que atraviesan niveles muy bajos de inmunidad materna y por lo general no son convenientes en la avicultura moderna, intermedias-intermedias son cepas atenuadas que atraviesan niveles medios de inmunidad materna y las intermedias plus o “calientes” son cepas atenuadas que atraviesan niveles elevados de inmunidad materna (Intervet, 2004).

El tipo de vacuna viva a utilizar depende de la patogenicidad de los virus de campo, requiriéndose vacunas “calientes” en zonas en donde es necesario proteger a las aves contra virus muy virulentos (vvIBDV). En zonas libres de estos virus los programas de vacunación están articulados sobre vacunas intermedias (Morales y Cardoso, 2002).

De manera ideal, la vacuna a virus vivo debería atravesar niveles elevados de anticuerpos maternos, poseer gran antigenicidad y baja patogenicidad, producir una respuesta mínima de larga duración y tener una amplia reacción cruzada contra cepas variantes (Brown, 1995).

12.2 Vacunas inactivadas

Por lo general, la mayoría de vacunas inactivadas se preparan a manera de emulsión agua en aceite. El adyuvante tiene gran efectividad y funciona como un depósito de antígeno. Este tipo de vacunas tienen la desventaja de requerir de aplicación individual por inyección intramuscular y generar leves granulomas

en algunos casos, por lo que su uso es casi exclusivo en reproductoras y ponedoras. El uso en reproductoras permite la transmisión de anticuerpos maternos a la progenie y su utilización requiere del uso previo de vacunas vivas para iniciar la memoria inmunológica (Kumar, 2003).

12.3 Programas de vacunación

En la actualidad no existe un programa de vacunación ideal para ser aplicado como único. El establecimiento de un programa de vacunación y la selección del tipo de vacuna depende de diversos factores que varían de una explotación a otra. Entre estos se debe considerar el grado de desafío, el tipo de virus de campo presente, el tipo y edad de las aves, la eficacia de los programas de bioseguridad y las condiciones de manejo en granja (Fernández, 2004; Villegas y Banda, 2001).

En reproductoras se emplean 2 ó 3 vacunas vivas de diferentes grado de atenuación (suaves o intermedias) para producir un número óptimo de células de memoria. Posteriormente entre 18 a 20 semanas, se emplea una vacuna inactivada que a largo plazo (45-50 semanas) proveerá inmunidad maternal a la progenie (Brown, 1995).

En pollos de carne el principal problema lo constituye el momento apropiado de la vacunación. Existen diversas opiniones para lograr una protección adecuada, ya que en ocasiones los títulos de anticuerpos maternos no son uniformes en el lote ni aún en pollos de la misma madre, lo cual crea inconvenientes para elaborar un programa de vacunación adecuado. En pollos con altos niveles de anticuerpos maternos las cepas vacunales de virus vivo podrían ser neutralizadas y no producir una respuesta inmune adecuada, contrariamente, pollos con bajos niveles de inmunidad pasiva pueden sufrir infección temprana e inmunosupresión (Haddad *et al.*, 1997; Villegas y Banda, 2001; Perera *et al.*, 2005).

13. FÓRMULA DEVENTER

Ante la inminente presencia del virus de EIB en campo, es necesaria la vacunación tan pronto sea posible. Con este fin, estimar el tiempo óptimo de

vacunación es de gran ayuda para un exitoso programa de vacunación. El principio detrás de la estimación del tiempo óptimo de vacunación involucra la medición del nivel de anticuerpos maternos a una edad temprana y, al existir un declive regular (escala log2) de los mismos, se puede predecir el momento en el que los niveles de anticuerpos maternos serán los suficientemente bajos para permitir la vacunación (de Witt, 2001).

En el campo se utilizan diferentes fórmulas para estimar la edad óptima de vacunación. Una de las primeras fórmulas fue desarrollada a finales de los años 80 por Kouwenhoven y van der Bros en el Instituto de Salud Aviar en Doorn, Holanda, actualmente integrado al Servicio de Salud en Deventer, Holanda). Esta fórmula fue desarrollada para el uso de vacunas intermedias plus, las cuales han ayudado a superar los brotes de cepas muy virulentas de la EIB (Lasher y Shane, 1994).

A partir de 1990, ante la cambiante situación del campo, esta fórmula fue reemplazada en Holanda por la fórmula Deventer (de Witt, 2001).

En la determinación de la edad óptima de vacunación, se deben considerar los siguientes factores, independientemente de la fórmula que se use (de Witt, 2001):

- a) *Número de muestras por parvada.* Se requiere un mínimo de 18 ejemplares por caseta para tener una muestra representativa de la parvada. Las determinaciones realizadas con menos de 18 muestras son poco confiables. Si las aves de dos galpones son de una misma progenie de reproductoras, las muestras de una sola caseta serán suficientes.
- b) *Calidad de los pollos usados para tomar las muestras.* Se deben tomar las muestras de pollos de primera calidad. Los pollos de segunda calidad (pollos deshidratados o enfermos) no son representativas de la parvada.

Si no se cumplen estas condiciones, la determinación de la edad óptima de vacunación no es confiable.

La fórmula Deventer, desarrollada por de Witt (2001), determina la edad óptima de la vacunación tomando en cuenta el título de anticuerpos maternos, el tiempo de vida media de los mismos, la edad a la toma de muestra y la patogenicidad de la cepa vacunal. Los diferentes tipos de vacunas rompen la barrera de los anticuerpos maternos a diferente nivel. De Witt para su fórmula Deventer señaló los siguientes niveles:

Tipo de vacuna	Intermedia fuerte	Intermedia intermedia	Intermedia suave
PGT de anticuerpos por ELISA Idexx	500	125	100

PGT: Promedio geométrico de título (ELISA)

La fórmula Deventer posee ciertas ventajas en comparación con otras fórmulas anteriormente descritas debido a que:

- a) Se puede usar para todo tipo de aves: pollos de carne, reproductoras y ponedoras.
- b) Las fechas de toma de muestras de sangre son flexibles, 1-10 días después del nacimiento.
- c) Permite determinaciones en parvadas con distribuciones uniformes y también irregulares de títulos.
- d) Se puede aplicar a todo tipo de vacunas comerciales.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Animales

Se emplearon 198 pollos de carne machos de la Línea Ross 308 provenientes de un mismo lote de reproductoras (57 semanas). 180 aves fueron criadas durante el experimento y 18 aves fueron sacrificadas al primer día de edad para la medición de anticuerpos maternos.

1.2 Vacunas:

Se usaron las siguientes vacunas comerciales:

Contra la Enfermedad Infecciosa de la Bursa:

- Bursine[®] 2, Laboratorios Fort Dodge Animal Health, conteniendo la cepa Lukert de tipo intermedia - suave
- Nobilis[®] Gumboro Broiler, Laboratorios Intervet, conteniendo la cepa 228 TC de tipo intermedia - intermedia
- Vi-Bursa[®]-C.E., Laboratorios Vineland, conteniendo la cepa C.E. de tipo intermedia – intermedia

Contra la Enfermedad de Newcastle (ENC) y Bronquitis infecciosa (BI):

- Cevac[®] Vitabron L, conteniendo la cepa PHLYMV-41(Enterotrópica)/Mass

1.3 Cepa de desafío

Se utilizó la cepa de desafío estándar F52/70, con un título de 10^3 DLE₅₀ /ml, proporcionada por los Laboratorios Intervet, Holanda. Se administró 50 µl/ave por vía ocular.

1.4 Equipos, materiales y reactivos

A) Materiales empleados para el muestreo serológico

- Frascos de vidrio estériles con tapón de goma.
- Algodón.
- Alcohol.
- Agujas descartables Nº 21 x ½
- Kit de ELISA (IDEXX, Inc. Westbrook, ME, USA) para la Enfermedad de Gumboro.

B) Materiales para toma de muestras de Bursas

- Frascos de vidrio con boca ancha con tapa
- Solución de formol al 10%.
- Bisturí, tijeras, pinzas

C) Materiales para histopatología

- Parafina en escamas.
- Alcohol etílico al 100%, 95% y 70%.
- Xilol
- Colorantes: Hematoxilina de Harris y Eosina.
- Neo Mount ®
- Láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos.
- Micrótomos
- Cuchillas.
- Baño María
- Estufa marca
- Microscopio Zeiss Axiostar Plus

D) Materiales usados en la medición de los parámetros biométricos

- Balanza electrónica

E) Material fotográfico

- Cámara digital marca Kodak.

F) Equipo de crianza

- Cama de viruta de madera
- Cortinas de polipropileno
- Balones de gas propano
- Criadoras a gas
- Termómetros digitales
- Bandejas PVC para pollo bebe
- Bebederos tonguitos
- Comederos tipo tolva
- Bebederos tipo canaleta
- Nordex plásticos de separación
- Separadores de madera y alambre
- Jabas de plástico
- Mochila de desinfección
- Equipo de limpieza y desinfección (escobas, rastrillos, escobillas, etc.)

2. MÉTODOS

2.1 Lugar de estudio

- Crianza: En las instalaciones experimentales de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Necropsia, serología y aislamiento viral: En el Laboratorio de Patología Aviar.
- Exámenes histopatológicos: En el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad.

2.2 Tamaño muestral

El tamaño muestral fue calculado utilizando el teorema del limite central donde $n \geq 30$. De acuerdo a esto se usaron 180 aves, 60 por grupo.

2.3 Diseño experimental

Las aves fueron distribuidas en tres grupos experimentales de 60 pollitos BB cada uno de acuerdo al siguiente diseño:

Grupo A:

Grupo de aves vacunados con un programa tradicional contra la EIB, dos veces a los 10 (Bursine[®] 2) y 18 días de edad (Vi-Bursa[®] CE)

Grupo B:

Grupo de aves vacunados una sola vez contra la EIB, a la edad determinada aplicando la fórmula Deventer.

Grupo C:

Grupo control, aves no vacunadas contra EIB.

Cronograma Integral de Vacunación

EDAD (días)	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
1	Marek ^{1/2} dosis (<i>sub cutanea</i>) y ENC + BI (<i>aerosol</i>)		
10	Vacuna contra la EIB cepa intermedia suave (<i>ocular</i>)	-	-
16	ENC + BI (<i>ocular</i>)		
18	Vacuna contra la EIB cepa Intermedia Intermedia (<i>ocular</i>)	-	No vacunado
(*)	-	Vacuna contra la EIB cepa Intermedia Intermedia (<i>ocular</i>)	

(*) Edad de vacunación según fórmula Deventer

2.3.1 Determinación de la edad de vacunación contra Gumboro:

La edad de vacunación fue determinada utilizando la fórmula Deventer según lo descrito por de Witt (2001) adaptada al programa comercial Microsoft Office Excel 2003 (Intervet, 2004)

$$\text{Edad de vacunación} = \left[(\log_2 T_{\text{ave}} \% - \log_2 T_{\text{rompebarrera}}) \times T^{1/2} \right] + E_m + C_{0-4}$$

Donde:

- $T_{\text{ave}} \%$ = Títulos de ELISA del lote muestreado
- $T_{\text{rompebarrera}}$ = Título rompe barrera materna (ELISA) de la

vacuna a usar (125)

- $T^{1/2}$ = Tiempo de vida media (ELISA) de los anticuerpos (3.0)
- E_m = Edad de las aves al muestreo (1)
- C_{0-4} = Días extra en que fue realizado el muestreo 0 a 4 Días de edad (4)

2.4 Manejo de los animales

Los tres grupos experimentales fueron criados en ambientes totalmente separados hasta su desafío a los 35 días de edad, en que fueron trasladadas a la unidad Experimental del Laboratorio de Patología aviar.

2.5 Desafío experimental

Se realizó un desafío experimental al día 35 de edad a 45 aves de cada grupo administrando una dosis de 50 μ L/ave de la cepa F52/70, con un título de 10^3 DLE₅₀ /ml, por vía ocular.

2.6 Parámetros de evaluación

La evaluación de la protección se realizó en base a dos criterios:

- a) Protección contra la enfermedad clínica:

Signos clínicos, mortalidad y lesiones macroscópicas en bursa

- b) Seguridad y efecto patogénico de las vacunas empleadas:

Índice bursal y lesiones microscópicas,

Adicionalmente fueron evaluados:

- a) Respuesta serológica.
- b) Parámetros productivos

2.6.1 Signos clínicos

Diariamente posterior al desafío se realizó la observación clínica de todas las aves en busca de depresión, diarrea y mortalidad. La evaluación de la diarrea se realizó asignando calificaciones de 0 a 3 según el grado de severidad, evidenciado por la presencia de heces acuosas en las plumas alrededor de la cloaca. La ausencia de diarrea fue calificada como 0 y las calificaciones de 1, 2

y 3 correspondieron a grados leves, moderados y severos de diarrea respectivamente.

2.6.2 Lesiones macroscópicas

Todas las bursas de las aves necropsiadas fueron observadas en busca de lesiones agudas consistentes en edema y/o hemorragia. Las aves vacunadas sin lesiones agudas a partir de los 4 días post desafío fueron consideradas protegidas del desafío.

2.6.3 Índice bursal

Con el fin de determinar presencia de atrofia bursal fue usado el índice bursal el que se obtuvo aplicando la siguiente fórmula descrita por Giambrone (1987).

$$\text{I.B.} = \frac{\text{Peso de la bursa (g)}}{\text{Peso corporal de ave}} \times 1000$$

El I.B. obtenido fue clasificado según lo descrito por Giambrone (1987) en:

1.5 - 3.5 = Bursa Normal

0.5 - 1.5 = Atrofia Bursal

≤ a 0.5 = Severa Atrofia Bursal

2.6.4 Lesiones microscópicas

Las bursas colectadas de las aves fueron fijadas en formol al 10%, luego fueron procesadas, teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E) y examinadas al microscopio de luz.

Posteriormente las láminas conteniendo los tejidos de bursa fueron examinadas histológicamente para determinar la severidad de la infección y confirmar los hallazgos macroscópicos. Los exámenes histológicos fueron realizados en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la FMV-

UNMSM. Se utilizó una calificación del 0 al 5 según lo descrito por Bautista *et al.* (2003) para describir el grado de las lesiones presente en las bursas, considerando la siguiente escala:

- 0: Sin lesión
- 1: Leve necrosis folicular
- 2: Moderada depleción linfoide folicular o severa depleción de algunos folículos
- 3: Severa depleción linfoide en más del 50% de folículos
- 4: Pérdida de arquitectura tisular del folículo con incremento de tejido conectivo. Linfocitos escasos + quistes + hiperplasia epitelial
- 5: Pérdida total de folículos y fibroplasia

Obtención de muestras de bursa de Fabricio:

Las bursas fueron obtenidas durante la necropsia de las aves realizada a los 35, 39, 42 y 45 días de edad. Previo al desafío se realizó la necropsia a 5 aves por grupo para una evaluación macroscópica e histológica de las bursas así como para el cálculo del índice bursal.

A los 4, 7 y 10 días post desafío se realizó la necropsia a 15 aves desafiadas de cada grupo para la evaluación de lesiones en la bursa de las aves desafiadas. Al 10^{mo} día post desafío la contraparte de aves no desafiadas de cada grupo (10 aves por grupo) fueron necropsiadas y evaluadas de igual forma que las desafiadas. Adicionalmente 5 bursas de las 15 aves necropsiadas de cada grupo fueron fijadas en formalina al 10% para la evaluación histopatológica.

2.6.5 Evaluación la respuesta serológica

a) Nivel de inmunidad pasiva de las aves empleadas en el estudio. Con este fin se colectaron 18 muestras de sangre al primer día para determinación de anticuerpos maternos contra EIB usando un kit de ELISA indirecto de los Laboratorios IDEXX. El valor de PGT (promedio geométrico de título) obtenido fue usado en el cálculo de la edad de vacunación por la fórmula Deventer.

b) Respuesta serológica semanal. Fueron colectadas 10 muestras de sangre (vía punción alar) de todos los grupos a los 7, 14, 21, 28, 35 (antes del desafío), 42 (7 días post desafío) y 45 días (10 días post desafío y fin de campaña) para la medición de los títulos de anticuerpos contra el virus de EIB por la misma prueba.

2.6.6 Medición de parámetros productivos

Semanalmente se registró el peso corporal, mortalidad y consumo de alimento semanal y acumulado con el fin de obtener el índice de conversión alimenticia y el índice de eficiencia productiva.

- **Índice de conversión alimenticia (I.C.A.)**

$$\text{I.C.A} = \frac{\text{Kg de alimento consumido}}{\text{Kg de carne producido}}$$

- **Índice de eficiencia productiva (I.E.P.)**

$$\text{I.E.P} = \frac{\text{Viabilidad} \times \text{Ganancia diaria de peso(g)} \times 100}{\text{I.C.A}}$$

2.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de variables se realizó utilizando el programa SPSS for Windows, versión 11.0

Los títulos de anticuerpos y parámetros productivos se evaluaron estadísticamente por la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía. En los grupos que se evidenció diferencia significativa ($p < 0,05$) se realizó la prueba de Duncan.

Los índices bursales y calificación de lesiones microscópicas se evaluaron estadísticamente por la prueba de Kruskal Wallis.

IV. RESULTADOS

1. INMUNIDAD PASIVA Y CÁLCULO DE LA EDAD DE VACUNACIÓN CONTRA GUMBORO EN LAS AVES DEL GRUPO B:

El lote de pollos utilizado presentó muy buen nivel y uniformidad de títulos de anticuerpos al virus de la EIB al primer día de edad, con un PGT de 6534 y un CV de 20.8. Estos valores fueron insertados en la fórmula Deventer. Al aplicar la fórmula Deventer, fue señalada la edad óptima de vacunación del grupo B a los 21 días de edad.

2. SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos observados en los días posteriores al desafío (PD) consistieron en una ligera depresión y la presencia de diferentes grados de diarrea en todos los grupos. No se observó mortalidad por Gumboro en ninguno de los grupos después del desafío. La depresión en las aves se observó a partir de los 2 días PD (38 días de edad) en un 30%, 30% y 40% para los grupos A, B y C respectivamente, la cual fue desapareciendo de manera gradual hasta los 5 días PD (40 días de edad) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje* de aves con depresión

desafiadas con la cepa F52/70

Grupo (días de vacunación)	Días post desafío (Edad en días)		
	2 (37)	3 (38)	4 (39)
A (10 y 18 días)	30	25	15
B (21 días)	30	20	15
C (Sin vacuna)	40	25	20

* Porcentaje aproximado

Se observó diarrea a partir del tercer día PD (38 días de edad) en un alto porcentaje de las aves desafiadas, con un 73.3%, 82.2% y 88.9% para los grupos A, B y C respectivamente la que fue incrementándose durante los días posteriores. En el grupo A el mayor porcentaje de aves con diarrea fue observado a los 7 días PD (42 días de edad) con un 93.3%, en el grupo B a los 10 días PD (45 días de edad) en el 92.9% de las aves y en el grupo C (control) igualmente a los 7 días PD (42 días de edad) pero en el 100% de las aves de este grupo (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Porcentaje de aves con diarrea
desafiadas con la cepa F52/70**

Grupo (días de vacunación)	Días post desafío (Edad en días)				
	3 (38)	4 (39)	5(40)	7(42)	10(45)
A (10 y 18 días)	73.3	84.4	83.3	93.3	73.3
B (21 días)	82.2	88.9	83.3	80.0	92.9
C (Sin vacuna)	88.9	97.8	86.7	100.0	93.3

Las aves que presentaron diarrea fueron evaluadas según el grado de severidad, siendo el grupo C (control) el que presentó mayor severidad de

diarrea post desafío en comparación a los grupos A y B, sin embargo las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$). (Cuadro 3).

Cuadro 3. Severidad de diarrea (promedio) de aves desafiadas con la cepa F52/70

Grupo (días de vacunación)	Días post desafío (Edad en días)				
	3 (38)	4 (39)	5 (40)	7 (42)	10 (45)
A (10 y 18 días)	1.2	1.4	1.3	1.8	1.1
B (21 días)	1.4	1.5	1.4	1.1	1.8
C (Sin vacuna)	1.7	1.7	1.7	2.1	1.5

0 = Sin diarrea

1 = Grado leve de diarrea

2 = Grado moderado de diarrea

3 = Grado severo de diarrea

3. LESIONES MACROSCÓPICAS

La principal lesión macroscópica observada en la bursa fue edema. Se manifestó por la presencia de bursas de aspecto brillante y húmedo, con un trasudado amarillento gelatinoso de consistencia suave que cubría la bursa, además pliegues turgentes y aumentados de tamaño en la superficie interna. A los 4 días PD (39 días de edad) ninguno de los grupos vacunados (A o B) presentó edema de la bursa, mientras que el grupo control evidenció un 20% de aves afectadas con esta lesión. A los 7 días PD (42 días de edad) en los grupos A y C se observó aves con edema de la bursa en un 60 y 53.3% respectivamente, mientras que en el grupo B un 13.3 %. A los 10 días PD (45 días de edad) en todos los grupos hubo un incremento considerable en el porcentaje de aves con edema, observándose 66.7%, 92.9% y 86.7% para los grupos A, B y C respectivamente (Cuadro 4). No se observó hemorragias a nivel de bursa en ninguna de las aves desafiadas.

**Cuadro 4. Porcentaje (%) de aves con edema en bursa
desafiadas con la cepa F52/70**

Grupo (días de vacunación)	Días post desafío (Edad en días)			Grupo sin desafiar
	4 (39)	7 (42)	10 (45)	45 días de edad
A (10 y 18 días)	0.0	60.0	66.7	25.0
B (21 días)	0.0	13.3	92.9	0.0
C (Sin vacuna)	20.0	53.3	86.7	0.0

4. ÍNDICE BURSAL (I.B.)

El valor del I.B. determinó si las bolsas fueron normales y atróficas. El valor promedio del I.B. se mantuvo dentro de los rangos de bursa normal en todos los grupos hasta los 42 días de edad (7 días PD), siendo el grupo B el que presentó los I.B más bajos. A los 45 días de edad (10 días PD) todos los grupos presentaron valores dentro de los rangos de atrofia bursal siendo de 1.23, 1.31 y 1.35 para los grupos A, B y C respectivamente. No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los grupos experimentales. Ninguno de los grupos presentó valores dentro de los rangos de atrofia severa. (Cuadros 5 y 6)

**Cuadro 5. Valores de Índice bursal promedio en aves
desafiadas con la cepa F52/70**

Grupo (días de vacunación)	Días post desafío (Edad en días)				Grupo sin desafiar
	0 (35)	4 (39)	7 (42)	10 (45)	45 días de edad
A (10 y 18 días)	2.64	1.80	1.76	1.23	1.63
B (21 días)	1.80	1.85	1.54	1.31	1.61
C (Sin vacuna)	2.01	1.89	1.57	1.35	1.45

1.5 - 3.5 = Bursa Normal

0.5 - 1.5 = Atrofia Bursal

≤ a 0.5 = Severa Atrofia Bursal (Giambrone, 1987)

**Cuadro 6. Aves con atrofia bursal (%) en grupos de aves desafiadas con
la cepa F52/70 a los 35 días de edad**

Grupo (días de vacunación)	Días post desafío (Edad en días)							
	0 (35)		4 (39)		7 (42)		10 (45)	
	Atrofia	Normal	Atrofia	Normal	Atrofia	Normal	Atrofia	Normal
A (10 y 18 días)	0.0	100.0	26.7	73.3	33.3	66.7	73.3	26.7
B (21 días)	0.0	100.0	33.3	66.7	33.3	66.7	78.6	21.4
C (Sin vacuna)	20.0	80.0	40.0	60.0	60.0	40.0	66.7	33.3

5. LESIONES MICROSCÓPICAS

De acuerdo a la calificación de 0 a 5 asignada para determinar severidad de lesiones histopatológicas, todos los grupos llegaron al desafío (35 días de edad) con calificaciones no mayores a 2.0. A partir del cuarto día PD en todos los grupos se evidenció un incremento gradual en la severidad de las lesiones. El grupo A obtuvo su mayor calificación (4.0) a los siete días PD, los grupos B y C obtuvieron sus mayores calificaciones (3.2 y 4.2 respectivamente) a los 7 y 10 días PD, respectivamente. A los 7 días PD las diferencias entre los grupos B y C fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 7. Calificación promedio de lesiones histopatológicas en bursa de aves desafiadas con la cepa F 52/70

Grupo (días de vacunación)	Días post desafío (Edad en días)				Grupo sin desafiar
	0 (35)	4 (39)	7 (42)	10 (45)	45 días de edad
A (10 y 18 días)	1.8	3.0	4.0	3.4	2.0
B (21 días)	2.0	3.0	3.2	3.2	2.0
C (Sin vacuna)	2.0	2.8	4.2	4.2	2.6

0: Sin lesión

1: Leve necrosis folicular

2: Moderada depleción linfóide folicular o severa depleción de algunos folículos

3: Severa depleción linfóide en más del 50% de folículos

4: Pérdida de arquitectura tisular del folículo con incremento de tejido conectivo

Linfocitos escasos + quistes + hiperplasia epitelial

5: Pérdida total de folículos y fibroplasia

(Bautista *et al.*, 2003)

6. EVALUACIÓN SEROLÓGICA

El promedio geométrico de títulos (PGT) de anticuerpos maternos del lote muestreado al 1er día de edad fue de 6534, con un coeficiente de variación de 20.8%. Posteriormente en todos los grupos los títulos descendieron gradualmente hasta el final del experimento (45 días de edad). No se obtuvo diferencia significativa ($p > 0.05$) en ninguno de los grupos con respecto a respuesta serológica a lo largo del estudio (Cuadro 8).

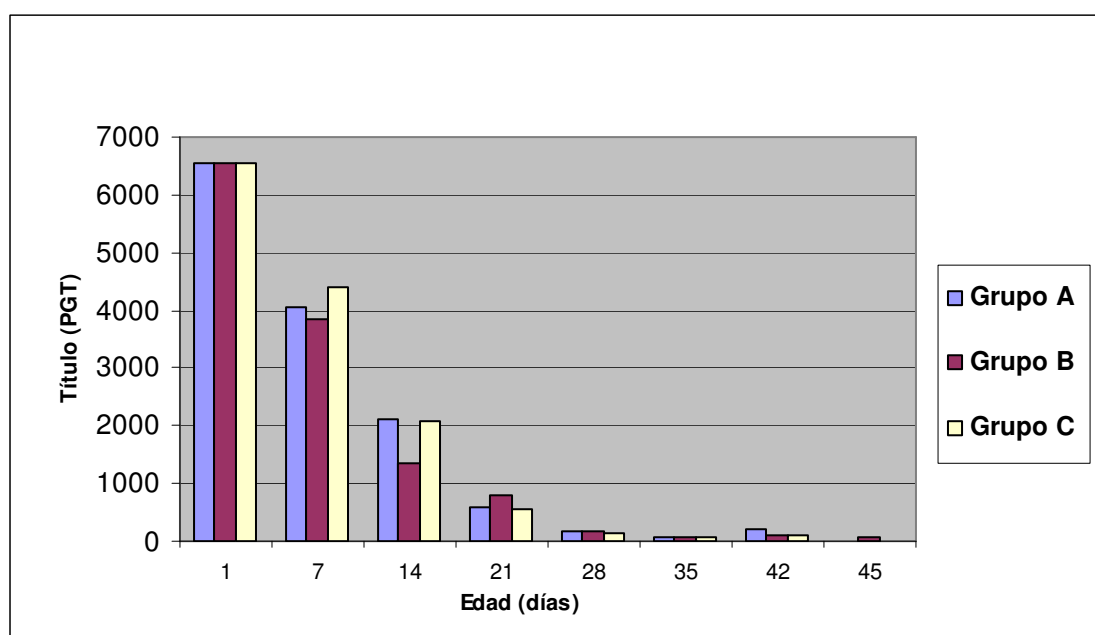
Cuadro 8. Títulos de anticuerpos (PGT) por ELISA en aves desafiadas con la cepa F52/70

Edad (días)		Grupo (días de vacunación)		
		A (10 y 18d)	B (21 días)	C (Sin vacuna)
1	PGT	6534	6534	6534
	CV %	20.8	20.8	20.8
7	PGT	4054	3860	4398
	CV %	25.6	31.5	21.6
14	PGT	2109	1365	2092
	CV %	70.4	42.2	39.5
21	PGT	599	790	562
	CV %	112.7	25.4	53.9
28	PGT	156	177	140
	CV %	70.1	34.8	53.9
35*	PGT	74	64	77
	CV %	57.3	115.8	98.8
42	PGT	225	102	100
	CV	109.0	54.7	36.7
45	PGT	7	74	10
	CV	259.5	272.5	269.4

PGT: Promedio geométrico de título, CV: Coeficiente de variación

* Desafío

Figura 1. Títulos de anticuerpos (PGT) por ELISA en aves desafiadas con la cepa F52/70 a los 35 días de edad



PGT: Promedio geométrico de título,

7. PARÁMETROS PRODUCTIVOS

Durante todo el experimento, el grupo A registro el mayor peso corporal promedio (Cuadro 9). Al final de campaña los pesos de los grupos A y B fueron similares al igual que el índice de conversión alimenticia, observándose una ligera diferencia a favor del grupo A (Cuadro 10). El peso del grupo C al final de campaña fue inferior en 182 g y 133 g respecto a los grupos A y B respectivamente. Sin embargo, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en el peso final entre los grupos experimentales.

Cuadro 9. Peso corporal (g) promedio semanal

Edad (Días)	Grupo (días de vacunación)		
	A (10 y 18d)	B (21 días)	C (Sin vacuna)
7	165.9	162.9	161.8
14	439.6	417.5	435.6
21	902.5	873.2	870.2
28	1470.6	1377.8	1437.1
35	2281.8	2222.9	2289.9
42	3002.7	2993.3	2842.6
45	3264	3215	3082

**Cuadro 10. Parámetros productivos de aves desafiadas
al final de campaña (45 días de edad)**

Grupo (días de vacunación)	Peso (g)	Peso* (g)	I.C.A	I.C.A**	I.E.P
A (10 y 18 días)	3264	2954	1.65	1.73	442.4
B (21 días)	3215	2954	1.66	1.73	414.8
C (Sin vacuna)	3082	2954	1.79	1.73	362.6

I.C.A.: Índice de conversión alimenticia. I.E.P.: Índice de eficiencia productiva

* Peso estándar para machos Ross 308 a los 45 días

** I.C.A. estándar para machos Ross 308 a los 45 días

V. DISCUSIÓN

La vacunación contra la EIB en reproductoras y su progenie sigue siendo el método de prevención y control más usado en la avicultura. Es conocido que las vacunas aplicadas en aves jóvenes pueden ser neutralizadas por los anticuerpos maternos por lo que es necesario estimar el momento en el que los niveles de anticuerpos maternos serán los suficientemente bajos para permitir la vacunación (de Witt, 2001). En este contexto, la fórmula Deventer es utilizada como una herramienta para determinar la edad óptima de vacunación y elaborar programas más eficaces y protectivos. En el presente estudio, se evaluó la efectividad de dos programas de vacunación contra Gumboro diseñados teniendo en cuenta dos criterios: Vacunando una sola vez a la edad determinada por la fórmula Deventer o vacunando a las aves con dos vacunas vivas aplicadas a las 10 y 18 días de edad como comúnmente se usa en campo cuando no se aplica la fórmula Deventer. Este cálculo permite vacunar a las aves antes de un posible desafío en condiciones de campo. El cálculo de la edad óptima para vacunar a las aves del grupo B aplicando la fórmula Deventer fue a los 21 días de edad; en esta evaluación realizada por la prueba de ELISA se observó que a los 21 días los títulos de anticuerpos maternos se mantuvieron por encima del nivel óptimo determinado para vacunas intermedias ($PGT=125$), esto significaría que a esta edad la vacuna podría ser todavía neutralizada por los anticuerpos maternos, sin embargo en estudios realizados por Perera *et al.* (2005) utilizando la fórmula de Kouwenhoven refieren que en pollos mantenidos en condiciones de granja, el descenso de la inmunidad materna puede ser más acelerado frente a un mayor

desafío de campo y que las aves podrían resultar susceptibles antes del tiempo estimado por dicha fórmula. Este adelanto en el cálculo permitiría también compensar otras fuentes de variabilidad que pudieran darse en el ambiente de la granja, como antecedentes reiterados de brotes, dificultades en el control sanitario para reducir el desafío de campo, así como las condiciones de manejo existentes en el momento de la crianza. En el presente estudio la edad de vacunación fue similar al reportado por Moraes *et al.* (2004) quienes evaluaron la patogenicidad de vacunas de variada virulencia en pollos SPF.

Es conocido que la enfermedad de Gumboro tiene dos tipos de presentación, la forma clínica y la forma subclínica o inmunosupresiva. Con el fin de evaluar la protección a la enfermedad clínica conferida por los dos programas de vacunación evaluados, los grupos fueron desafiados con una cepa estándar del IBDV F52/70. Los signos clínicos observados después del desafío consistieron en depresión y diarrea (heces sueltas). La presentación de diarrea se atribuye a la replicación inicial del virus a nivel intestinal (GALT), produciendo un daño a nivel de las vellosidades y un aumento en la permeabilidad del intestino (Pérez, 2005). El grupo C presentó 100% de aves afectadas con este signo, mientras que en los grupos A y B se observó un 93.3% y 92.9% de aves afectadas respectivamente. Signos similares son descritos por Pérez (2005) en aves desafiadas igualmente con la cepa F 52/70 quien observó porcentajes elevados a los 6 días PD (82.2, 66.7 y 95.5% para sus grupos A, B y control respectivamente). Sin embargo los signos observados no fueron tan severos como los referidos por Lukert y Saif (2003) ya que no se llegaron a observarse diarreas acuosas y blanquecinas como señalan dichos autores.

Otro parámetro a evaluar fue la presentación de mortalidad post desafío. Estudios previos realizados por Scanavini *et al.* (2004) describen porcentajes de mortalidad de entre 10 y 15% en pollos SPF inoculados experimentalmente con la cepa clásica virulenta F52/70 del IBDV. En el presente estudio, no se observó mortalidad después del desafío en ninguno de los grupos experimentales. La patogenicidad de las cepas de Gumboro es variable, Yamaguchi *et al.* (1996) refieren que algunas cepas ocasionan solo

enfermedad subclínica, mientras que otras producen alta mortalidad. La cepa de desafío utilizada en nuestro experimento fue una cepa patógena, sin embargo produjo enfermedad clínica sin mortalidad debido a que las aves utilizadas fueron de tipo comercial, en las que la acción de los anticuerpos maternos aún está presente y cumple también una función reguladora del sistema inmune, por otro lado este estudio fue hecho bajo condiciones experimentales y en ausencia de factores de stress adicionales como ocurre con los brotes de enfermedad clínica por exposición natural en campo en donde es posible observar porcentajes de mortalidad que pueden ser muy altos debido a las condiciones de la crianza intensiva de campo. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Ahmed *et al.* (2003) quienes evaluando la respuesta inmune de cuatro vacunas contra la EIB en pollos de carne comerciales no observaron mortalidad después del desafío. Igualmente Pérez (2005) reportó ausencia de mortalidad en aves desafiadas con la cepa F52/70 usando también aves de tipo comercial.

Las lesiones macroscópicas observadas en la bursa de fabricio de todos los grupos después del desafío evidenciaron edema con presencia de un trasudado amarillento gelatinoso, lo que concuerda con los hallazgos clásicos de enfermedad clínica por EIB descritos previamente (Lasher y Shane, 1994; Lukert y Saif, 2003). Los hallazgos anátomopatológicos a lo largo del experimento evidencian una mejor protección en la aves del grupo A (66.7% a 10 días PD) versus el grupo B (92.9% a 10 días PD) en lo que respecta a la presentación de edema bursal que es la manifestación más importante de enfermedad clínica. Probablemente en nuestro experimento debido a las óptimas condiciones de crianza y el bajo nivel de desafío los anticuerpos maternos permanecieron altos hasta más allá de los 21 días de edad ocasionando neutralización del virus vacunal y menor protección en este grupo. Ha sido señalado que en brotes naturales de campo con el virus de EIB se observa edema entre los 2 a 3 días post infección. (Morales, 1993). Esto difiere de lo obtenido en nuestro experimento en donde se ha observado edema hasta los 10 días PD, estas diferencias pueden ser atribuidas a la mayor patogenicidad de la cepa de desafío utilizada en comparación a las que comúnmente están presentes en los desafíos de campo.

Los valores del índice bursal para los grupos, A (2.64), B (1.80), C (2.09) y la ausencia de lesiones macroscópicas evidencian el estado normal de las bolsas en los tres grupos experimentales previo al desafío a los 35 días de edad. Estos valores fueron menores a los descritos por Huapaya (1994) quien refiere un índice bursal de 3.21 en pollos no vacunados contra Gumboro y bajo condiciones normales de crianza.

A los 4 días post desafío se observó una disminución considerable en los valores del índice bursal (1.80, 1.85 y 1.89 para A, B y C respectivamente) respecto a los valores previos al desafío (2.64, 1.80 y 2.01 para A, B y C respectivamente), sin embargo el índice bursal promedio de los tres grupos se mantuvo dentro de los rangos normales hasta los 7 días PD (1.76, 1.54 y 1.57 para los grupos A, B y C respectivamente). A los 10 días PD, según la escala de Giambrone (1987), se observó valores compatibles con atrofia bursal (1.23, 1.31, 1.35 para A, B y C respectivamente) en todos los grupos. Una tendencia similar fue reportada en trabajos realizados por Rautenschlein *et al.* (2003) quienes obtuvieron calificaciones de bursa normal 3 días post inoculación en sus grupos experimentales, y posteriormente a partir del 5to día post inoculación observaron una tendencia a la atrofia bursal en los grupos inoculados con cepas intermedias y virulentas.

Los bajos valores de IB obtenidos en los grupos de aves desafiados con la cepa F52/70 de la EIB evidencian la patogenicidad de dicha cepa. De otro lado la atrofia observada en el grupo C de las aves no desafiadas evidencia que ocurrió un desafío natural como siempre ocurre cuando se crían animales fuera de unidades de aislamiento, pero probablemente este desafío ocurrió con una cepa de menor patogenicidad que ocasiono atrofia bursal solamente en el grupo no vacunado y no desafiado y no en los grupos de aves vacunadas no desafiadas. Además que el grado de atrofia observada en este grupo fue de menor severidad que en los grupos experimentalmente desafiados.

La evaluación histopatológica de la bolsas a los 35 días mostró lesiones de grado 2 equivalentes a moderada depleción en los tres grupos experimentales.

Las lesiones observadas antes del desafío sugieren daño bursal temprano producido probablemente por la replicación del virus vacunal en los grupos A y B. Estas observaciones coinciden con los estudios realizados por Toscano *et al.* (2003) quienes detectaron la presencia de lesiones en bursa a los 14 y 21 días post vacunación en aves vacunadas con cepas intermedias. Pérez (2005) reporta lesiones de grado leve y moderado en grupos vacunados con cepas intermedias e intermedias plus respectivamente mientras que Gallardo (1999) observó una severa atrofia bursal en aves vacunadas a los 12 días con una cepa intermedia. Las lesiones en el grupo C (control) podrían atribuirse a una diseminación mecánica del virus, debido a que en principio el virus de Gumboro es ubicuo y además que en condiciones de crianza abierta esto ocurre con frecuencia. Entre 7 a 10 días PD se observó un incremento en el grado de lesiones en los tres grupos, observándose a los 10 días PD la mayor severidad de lesiones en el grupo C (4.2), seguido por el grupo A (3.4) y B (3.2), lo cual evidencia un daño severo ocasionado por la replicación activa del virus de desafío en la bursa de las aves de todos los grupos y que ningún programa de vacunación protege completamente a las bolsas de este efecto. Resultados similares fueron obtenidos por Pérez (2005) y García-García *et al.* (2002) quienes reportan diversos grados de lesión (entre moderados y severos) en bolsas de aves vacunadas y desafiadas. Otros estudios realizados en aves SPF por Ley *et al.* (1983) describen un incremento de tejido conectivo interfolicular acompañado de una moderada depleción linfóide de los folículos a los 7 días post inoculación y con lesiones mas severas al 10mo día post inoculación, lo cual coincide con los hallazgos observados en el presente estudio. De manera similar la observación de apoptosis celular linfóide en todos los grupos experimentales post desafío corroboran los estudios realizados por Babaahmady *et al.* (2005) quienes observaron apoptosis de células linfoides tanto en aves inoculadas como en aves de campo, al igual que los trabajos de Jungmann *et al.* (2001) que sugieren la existencia de mecanismos indirectos involucrados en la inducción de apoptosis *in vivo* y que contribuyen a una rápida depleción linfóide en bolsas afectadas.

La evaluación serológica al día de edad muestra elevados niveles de anticuerpos maternos (TPG = 6535) en los tres grupos experimentales, con

un coeficiente de variación ($CV=20.8$) que evidencia además una muy buena uniformidad de los mismos en el lote. Durante los muestreos semanales se observó que los títulos de anticuerpos fueron declinando de manera gradual hasta el final del experimento (45 días de edad) donde se obtuvieron títulos de 7, 74 y 10 para los grupos A, B y C respectivamente. Aún cuando a los 7 días PD se observó una ligera elevación de los títulos en todos los grupos (151, 38 y 23 puntos más para A, B y C respectivamente) con respecto al día 0 (desafío) ninguna de las muestras alcanzó títulos cuyos valores sean considerados positivos a la prueba. Esta ligera elevación en los títulos al día 7 PD no la consideramos relevante ya que a los 10 días PD (fin del experimento) estos disminuyeron a niveles por debajo de los días previos al desafío y por lo tanto podemos afirmar la ausencia de seroconversión hasta el final del estudio.

En los grupos A y B (vacunados) la ausencia de seroconversión coincidió también con la aparición del mayor porcentaje de lesiones macroscópicas (edema en bursa) a los 45 días, lo que sugiere una replicación tardía del virus de desafío que no dio tiempo para la formación de anticuerpos protectivos. Es conocido que la seroconversión se produce cuando finaliza la fase clínica de cualquier enfermedad de curso agudo y en una primoinfección, y en nuestro estudio hasta el final del experimento esto no ocurrió. En trabajos realizados por Jackwood *et al.* (1999) no se observó evidencia de una relación entre los títulos generados por ELISA y el porcentaje de protección observado en aves desafiadas con cepas variantes. Por otro lado, la presencia de lesiones histopatológicas de grado 2.0 a los 35 días evidencian un daño bursal moderado por efecto del virus vacunal y las lesiones de grado 3 y 4 durante los días posteriores al desafío sugieren un daño bursal severo ocasionado por la replicación del virus de desafío. Recientemente, estudios realizados por Rautenschlein *et al.* (2005) sugieren que la protección contra el virus de desafío puede estar mediada por una “bursectomía” viral inducida por el virus vacunal y que en pollos con presencia de anticuerpos maternos la seroconversión al virus de la EIB puede retrasarse mas no suprimirse. Estos mismos autores señalan que la protección contra el virus de desafío se debe a la falta de células blanco (células B) ocasionada por el virus vacunal, impidiendo así la replicación del virus de desafío. Kim *et al.* (1999) demostraron que la replicación del virus de la EIB es acompañada de una infiltración de células T

en los sitios de replicación viral. Posteriormente Kim *et al.* (2000) determinaron que el virus induce la presencia de células T CD4+ y T CD8+ activas que son capaces de expresar citoquinas. Estos estudios sugieren que existe una respuesta mediada por células T intrabursales que puede ser importante en los mecanismos de remoción viral y la recuperación de la infección a largo plazo, variables que no han sido medidas en este trabajo, pero que sugieren que este mecanismo estaría involucrado en la protección al desafío de las aves en ausencia de seroconversión.

La evaluación de parámetros productivos muestra que el mayor peso corporal a los 35 días (previo al desafío) lo obtuvo el grupo C, mientras que a los 45 días (final de campaña) el mayor peso se registró en los grupos A y B. Del mismo modo ambos grupos registraron el menor índice de conversión alimenticia (I.C.A.) y un mayor índice de eficiencia productiva (I.E.P.) con respecto al grupo C. La ganancia de peso en los grupos A, B y C durante el desafío fue de 982 g, 992 g y 792 g respectivamente, además se puede observar que los grupos A y B obtuvieron un peso corporal e I.C.A. superior al estándar, mientras que el grupo C a pesar que obtuvo un peso superior al estándar tuvo un I.C.A. inferior al estándar. Estos resultados evidencian que la vacunación contra Gumboro protege a las aves de los efectos negativos que produce el desafío sobre los parámetros productivos a pesar que entre los grupos no se observó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), pero que en el campo estas ligeras diferencias representan considerables ganancias o pérdidas económicas. Cabe resaltar que el tamaño muestral utilizado en el presente estudio no fue el óptimo requerido ya que al final del estudio solo terminaron 15 aves por grupo, lo que está por debajo de lo requerido por el teorema del límite central pero ello debido a limitantes de tipo logístico, que en estudios posteriores se deberían subsanar. Es de notar que la evaluación de la protección de los diversos programas de vacunación contra Gumboro no es eficientemente medida utilizando solamente el criterio de evaluación de lesiones patológicas macro y microscópicas ni tampoco tomando solamente como en este estudio la evaluación serológica, sino que es indispensable usar principalmente el criterio de evaluación de parámetros productivos, por que en ellos se refleja notoriamente la ventaja de la vacunación. Por ello, teniendo en

cuenta este criterio en el presente estudio se obtuvo mejor protección en las aves vacunadas con el programa tradicional versus las aves vacunadas aplicando la fórmula Deventer. Como se mencionó anteriormente las buenas condiciones de bioseguridad y bajo desafío con que fueron criadas las aves en este experimento permitió que la velocidad de caída de anticuerpos maternos sea mas lenta y que a los 21 días las aves hayan tenido niveles mas altos que lo esperado neutralizando en parte la única vacuna aplicada y disminuyendo su eficiencia. Probablemente en crianzas bajo condiciones de campo donde sucede todo lo contrario este método sea más efectivo, por lo que sería recomendable una evaluación similar a esta pero bajo condiciones de campo.

VI. CONCLUSIONES

1. Ninguno de los grupos fue protegido del edema bursal ni de la atrofia bursal inducidos por la cepa de desafío y observados hasta los 10 días posteriores al desafío.
2. El edema bursal observado hasta los 10 días post desafío evidencia una replicación tardía del virus que no permitió detectar seroconversión en ninguno de los grupos
3. Los grupos vacunados obtuvieron las mayor performance productiva tal como fue observado por la mejor conversión alimenticia, mayor eficiencia productiva y mayor peso corporal obtenido en los grupos vacunados A (182g+) y B (133g+), lo cual evidencia que los parámetros productivos de los grupos vacunados no se vieron afectados por la cepa de desafío
4. Dentro de los dos grupos vacunados la mejor protección fue observada en el grupo A vacunado con el programa tradicional en comparación al grupo B vacunado aplicando la fórmula Deventer, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

VII. LITERATURA CITADA

1. **Abdel-Alim, G.; Awaad, M. and Saif, Y.M. 2003.** Characterization of Egyptian field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 47:1452-1457.
2. **Ahasan, M.; Hossain, K. and Islam, M. 2002.** Adaptation of infectious bursal disease virus (IBDV) on vero cell line. *J. Biol. Sci.* 2(9): 633-635.
3. **Ahmed, Z.; Inayat, S.; Naeem, K. and Malik, S. 2003.** Comparative immune response pattern of commercial infectious bursal disease vaccines against field isolates in Pakistan. *Int. J. Poult. Sci.* 2(6):449-453.
4. **Al-Natour, M.; Ward, L; Saif, Y.; Stewart-Brown, B. and Keck, L. 2004.** Effect of different levels on maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 48:177-182.
5. **Alzola, R. 2002.** Tejido hemacitopoyético linfoide (sistema inmunitario). En: Cátedra de Histología, Embriología y Teratología. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. pp 18-19.
6. **Babaahmady, E.; Joa, R. y Noda, J. 2005.** Enfermedad de Gumboro. Histopatología de la bursa de Fabricio en la enfermedad natural y experimental en pollos de engorde. *Rev. Electrónica de Veterinaria*

7. **Banda, A. y Villegas, P. 2001.** Gumboro: Métodos de diagnóstico e interpretación de resultados. En: X Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. Georgia. U.S.A. pp. 12-28.
8. **Banda, A. y Villegas, P. 2004.** Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. *Avian Dis.* 48:540-549.
9. **Banda, A.; Villegas, P.; El-Attrache, J. and Estevez, C. 2001.** Molecular characterization of seven isolates of infectious bursal disease virus obtained from commercial broilers chickens. *Avian Dis.* 45:620-630.
10. **Banda, A.; Villegas, P. and El-Attrache, J. 2003.** Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Dis.* 47:87–95.
11. **Banda, A.; Villegas, P. and El-Attrache, J. 2004.** Heteroduplex mobility assay for genotyping infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 48:851-862.
12. **Banks, W. 1995.** Histología veterinaria aplicada. 2da edición. Ed. Manual Moderno. México. D.F. pp. 727.
13. **Bautista, D.; Elankumaran, S; Heckert, R. 2003.** Effect of a variant infectious bursal disease virus (e/del) on *Salmonella typhimurium* infection in commercial broiler chickens. *Avian Dis.* 48: 361-369.
14. **Brandt, M.; Yao, K.; Liu, M.; Heckert, R. and Vakharia, V. 2001.** Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75(24):11974–11982.
15. **Brown, M. 1995.** La enfermedad de Gumboro: Una nueva alternativa para su control. *Mundo Avícola.* 3(15):32-34.

16. **Butcher, G. and Miles, R. 1995.** Infectious bursal disease (Gumboro) in commercial broilers. University of Florida. Corporative Extension Service. Institute of Food and Agriculture Science. Document VM-84. pp.4
17. **Calier Laboratorios. 2002.** Aproximación a la inmunología. Servicios Técnicos S.A. pp. 4.
18. **Cardoso, B. y Morales, O. 2004.** Enfermedad de Gumboro: Problemática y control. En: Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Aves. AMEVEA. Colombia. pp. 4.
19. **Carlander, D. 2004.** Avian Ig Y antibody: In vitro and in vivo. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Faculty of Medicine. Uppsala University. Sweden.
20. **Castro-Pozo, X. 1994.** Evaluación de parámetros productivos y respuesta inmune en pollos de carne vacunados con dos programas de vacunación contra la enfermedad de Gumboro. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Univ. Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú. 56 p.
21. **Ceva. 2002.** Gumboro Disease. En : Cevac Transmune IBD. Corporate Communications Standards. SDB Biological Bulletin. pp. 1-22.
22. **Chevalier, C.; Gallaux, M.; Pous, J.; Henry, C; Da Costa, B.; Novaza, J.; Lepault, J. and Delmas, B. 2005.** Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. Abstract. J. Virol. 79(19):12253-12263.
23. **Contreras, M. 2003.** Vacunaciones y respuesta serológica. En: XVIII Congreso Latinoamericano de Avicultura. Bolivia. pp 3.
24. **de Witt, J.J. 2001.** Gumboro Disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Annual report and proceedings of COSTAction 839: Immunosuppressive viral diseases. Deventer, the Netherlands pp. 170-178.

25. **Dybing, J and Jackwood, D.J. 1996.** Restriction analysis of MD infectious bursal disease virus strain. Avian Dis. 40:931-937.
26. **Fernández, R. 2004.** La enfermedad de Gumboro: Observaciones clínicas, prevención y control. Mundo Avícola 3(50): 26-27.
27. **Gallardo, W. 1999.** Evaluación serológica e histopatológica de pollos broilers vacunados contra la enfermedad de Gumboro a los doce días de edad. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Univ. Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú. 63 p.
28. **Gardin, Y. 2003.** Enfermedad de Gumboro muy virulenta en Latinoamérica: Puntos importantes y consecuencias prácticas. En: XVIII Congreso Latinoamericano de Avicultura. Bolivia.
29. **García-García, J.; Gay, M.; Suárez, A.; Escamilla, J.; Aranda, M.; Soto, E.; Sarfati, D.; Morales, A. y Lozano, B. 2002.** Caracterización de un aislamiento mexicano de un virus de Gumboro. En: XXVII Convención Anual. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta. México.
30. **Gay, M.; Escamilla, J.; Suárez, J.; Soto, E.; Lozano, B.; Sarfati, D.; Vazquez, D.; Morales, A. y García-García, J. 2002.** Protección conferida por vacunas emulsionadas contra un aislamiento local del virus de Gumboro, En: XXVII Convención Anual. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta. México.
31. **Genova, K. 2000.** Influence of infectious bursal disease virus strains on the avian immune system. Exp. Pathol. Parasitol. April: 27-29.
32. **Giambrone, J. 1987.** Evaluación y relaciones morfométricas en la Enfermedad infecciosa de la bursa como método de diagnóstico. Publication: The American Association of Avian Pathology. Georgia. U.S.A. 24-38.

33. **Haddad, E.; Whitfill, C.; Avakian, A.; Ricks, C.; Andrews, P.; Thoma, J. and Wakenell, P. 1997.** Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.* 41:882-889.
34. **Hirai, K. and Calnek, B. 1979.** In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cells lines and chicken B lymphocytes. *Infect. Immun.* 25(3):964-970.
35. **Hirai, K and Shimakura, S. 1974.** Structure of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 14(4):957-964.
36. **Hoerr, F. 2002.** Actualization of the mechanism of development of the immune response. En: I Seminario Internacional de Avicultura 6,7 y 8 Marzo. Lima. Perú.
37. **Huapaya, J. 1994.** Evolución de la bursa de Fabricio en pollos broiler: Estudio anátomo histológico. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Univ. Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú. 45 p.
38. **Hussain, I.; Zahoor, M.; Rasool, M; Shahid Mahmood, M.; Mansoor, M. and Ríaz, M. 2003.** Detection of serum antibody levels against infectious bursal disease (IBD) virus using indirect hemagglutination (IHA) test in commercial broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 2(8):442-448.
39. **Icochea, E.; Alba, M.; González, R.; Contreras, M.; Dávila, E. y Mengel-Whereat, S. 2002.** Identificación de virus de la enfermedad de Gumboro en el Perú por ELISA de captura de antígeno. En: XXVII Convención Anual. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta. México.
40. **Inoue, M; Fujita, A. and Maeda, K. 1999.** Lysis of myelocytes in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Vet. Pathol.* 36: 146-151.
41. **Intervet. 2004.** Enfermedad de Gumboro. Disponible en: <http://www.enfermedad-gumboro.com>

42. **Jackwood, D.J.; Saif, Y.M. and Hughes, J. 1982.** Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Dis.* 26:871-882.
43. **Jackwood, D.J. and Jackwood, R.J. 1997.** Molecular identification of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 41:97-104.
44. **Jackwood, D.J.; Sommer, S.E. and Odor, E. 1999.** Correlation of enzyme linked immunosorbent assay titers with protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 43:189-197.
45. **Jackwood, D.J. 2001.** Infectious bursal disease: World wide situation. En: IX Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. Georgia. U.S.A.pp. 8-10.
46. **Jackwood, D.J.; Sommer, S. and Knoblich, H. 2001.** Aminoacids comparison of infectious bursal disease viruses placed in the same or different molecular group by RT/PCR-RFLP. *Avian Dis.* 45:330-339.
47. **Jungmann, A.; Nieper, H. and Müller, H. 2001.** Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *J Gen. Virol.* 82:1107-1115.
48. **Kim, I.J.; Gagic, M. and Sharma, J. 1999.** Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 43:401-413.
49. **Kim, I.J.; You, S.; Kim, H.; Yeh, H. and Sharma, J. 2000.** Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 74(19):8884-8892.
50. **King, A. 2000.** Sistema linfático de las aves. En: Anatomía de los animales domésticos. Sisson y Grossman (ed). 7ma edición. Tomo II. Cap. 68. Salvat editores. Barcelona. España.

51. **Kulíková, L.; Jurajda, V. y Juranová, R. 2004.** Effects of infectious bursal disease vaccination strains on the immune system of Leghorn chicks. *Acta Vet. Br.* 73:205 -209.
52. **Kumar, M. 2003.** Desarrollo de vacunas efectivas contra la infección de la bolsa de Fabricio. En: I Taller de Gumboro. Lima-Trujillo. Perú.
53. **Lasher, H.N. and Shane, S.M. 1994.** Infectious bursal disease. *World's Poult. Sci. J.* 50(2):133-158.
54. **Ley, D.; Yamamoto, R. and Bickford. 1983.** The pathogenesis of infectious bursal disease: Serologic, histopathologic and clinical chemical observations. *Avian Dis.* 27:1060-1085.
55. **Lima, M.; Calderón, A.; Fehervari, B. y Fortoul, T. 2002.** Cambios hematológicos en aves infectadas con la cepa 73688 altamente patógena del virus de infección de bolsa de Fabricio. En: XXVII Convención Anual. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta. México.
56. **Lombardo, E; Maraver, A.; Espinosa, I.; Fernández-Arias, A. and Rodríguez, J. 2000.** VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induce cell lysis. *Abstract. Virol.* 277(2):345-357.
57. **Lukert, P.D. and Saif. V. M. 2003.** Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry.* 11th Edition. Saif. V.M (ed). Iowa State Press. USA. pp 161-179.
58. **Lunger, P. and Maddux, T. 1972.** Fine-structure studies of avian infectious bursal agent. I. In vivo viral morphogenesis. *Avian Dis.* 16:874-893.
59. **Majó, N.; El-Attrache, J.; Banda, A.; Villegas, P; Ramis. A.; Pages, A. and Ikuta, N. 2002.** Molecular characterization of spanish infectious bursal disease virus field isolates. *Avian Dis.* 46: 859-868.

60. **Martínez-Torrecuadrada, J.; Lázaro, B.; Rodríguez, J and Casal, I. 2000.** Antigenic properties and diagnosis potencial of baculovirus-expressed infectious bursal disease virus proteins VPX and VP3. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7(4):645-651.
61. **Mittal, D.; Jindal, N.; Gupta, S.L.; Kataria, R.S. and Tiwari, A.K. 2005.** Detection of infectious bursal disease virus in field outbreaks in broiler chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Int. J. Poult. Sci. 4 (4): 239-243.
62. **Moraes, H.; Salle, C.; Padilla, A.; Nascimento, V.; Souza, G.; Pereira, R.; Artencio, J. and Salle, F. 2004.** Infectious bursal disease: Evaluation of pathogenicity of commercial vaccines from Brazil in specific pathogen free chickens. Braz. J. Poult. Sci. 5(4):243-247.
63. **Morales, O. y Cardoso, B. 2002.** Enfermedad de Gumboro – La vacunación como parte del control. En: V Seminario en Ciencias Avícolas. Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Aves. AMEVEA. Bolivia. pp. 94-97.
64. **Morales, O.1993.** La enfermedad de Gumboro. Mundo Avícola 2(8): 21-24.
65. **Müeller, H; Scholtissek, K. and Becht, H. 1979.** The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. J. Virol. 31(3):584-589.
66. **OIE. 2004.** Infectious bursal disease (Gumboro disease). In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Part 2. Section 2.7. Chapter 2.7.1. Disponible en http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00102.htm
67. **Pereira, S.; Travassos, C.; Huguenim, A.; Guimarães, A.; Silva, A. y Guimarães, M. 1998.** Western Blot detection of infectious dorsal disease virus infection. Braz. J.Mod. Biol. Ros. 31(5):671 – 674.

68. **Perera, C.; Noda, J.; Cordas, L.; Alfonso, P. y Cuello, S. 2002.** Caracterización de la cepa BF8 del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa. Rev. Cubana de Ciencia Avícola 26:111-119.
69. **Perera, L.; Noda, J.; Cuello, S. Alfonso, P; Espinosa, V. y Merino, A. 2005.** Vacunación asistida por serología para la enfermedad infecciosa de la bolsa. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol 6 Nº 5. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
70. **Pérez, C. 2005.** Evaluación de dos programas de vacunación que contienen la cepa 2512 de la enfermedad de Gumboro frente a la infección experimental con la cepa F 52/70. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Univ. Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú. 60 p.
71. **Phong, S.; Hair-Bejo, M., Omar, A. y Aini, I. 2003.** Sequence analysis of malasian infectious bursal disease virus isolated and use of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay for detection of VP2 hypervariable region. Avian Dis. 47:154 -162.
72. **Pope, C. R. 1996.** Lymphoid System. In: Avian Histopathology. 2nd edition, Riddell C. (ed). The American Association of Avian Pathologists. Georgia. U.S.A. pp.17-39.
73. **Rautenschlein, S.; Yeh, H. and Sharma, J. 2003.** Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic infectious bursal disease virus. Avian Dis. 47:66-78.
74. **Rautenschlein, S.; Kraemer, Ch.; Vanmarcke, J. and Montiel, E. 2005.** Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. Avian Dis. 49:231-237.
75. **Salem, J.; Rosemberger, J.; Cloud, S.; Pope, C.; Sample, B. and Mengel-Whereat, S. 2003.** Practical assessment of protection against

- infectious bursal disease virus. In: National Meeting on Poultry Health & Processing sponsored by the Delmarva Poultry Industry, Inc. USA. pp. 5.
76. **Saif, Y. 2003.** Vacunas y vacunación contra la enfermedad de Gumboro. Mundo Avícola y Porcino 1(43):7-8.
77. **Scanavini, N.; Ito, N.; Miyaji, C.; Lima, E; Okabayashi, S.; Corrêa, A.; Eleuterio, G. and Zuanaze, M. 2004.** Infectious bursal disease virus: Case report and experimental studies in vaccinated and unvaccinated SPF chickens and commercial broiler chicks. Braz. J. Poult. Sci. 6(1):41-54.
78. **Sellers, H.; Villegas, P.; Seal, B. and Jackwood, D.J. 1999.** Antigenic molecular characterization of three infectious bursal disease virus field isolates. Avian Dis. 43:198-206.
79. **Sellers, H.; Villegas, P.; El-Attrache, J.; Kapczynski, D. and Brown, C. 2001.** Detection of infectious bursal disease virus in experimentally infected chickens by in situ hybridization. Avian Dis. 45:26 -33.
80. **Sivanandan, V. and Maheswaran, S. 1980.** Immune profile of infectious bursal disease (IBD). II. Effect of IBD virus on pokeweed-mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes of chickens. Avian Dis. 24:734-743.
81. **Tacken, M.; Peeters, B.; Thomas, A.; Rottier, P. and Boot, H. 2002a.** Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. J. Virol. (76)22:11301-11311.
82. **Tacken, M.; Rottier, P.; Gielkiens, A. and Peeters, B. 2002b.** Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease: capdis proteins VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. J. Gen Virol. 81:209-218.
83. **Talavera, B. 1994.** Reconocimiento de lesiones macro y micro de los órganos linfoides de aves con cuadros de inmunosupresión. Tesis de

Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Univ. Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú. 48 p.

84. **Tizard, I. 1998.** Inmunología veterinaria. 5ta edición. Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A. México. D.F.
85. **Torrents, D.; Maldonado, J.; Saubi, N.; Pages-Mante, A. 2004.** Dogs as potential carriers of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 33 (2):205-209.
86. **Toscano, A.; Jiménez, A.; Rodríguez, E.; Gómez y Chapa, J. 2002.** Determinación del daño a la bolsa de Fabricio causada por la aplicación de vacunas a virus vivo con cepas intermedias, así como la protección al desafío. En: XVII Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Pto Vallarta. México.
87. **Villegas, P. y Banda, A. 2001.** Control de la enfermedad infecciosa de la bolsa y de la anemia infecciosa aviar. En: XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura. 9 -12 Octubre. Guatemala. pp. 1-8.
88. **von Einem, U.; Gorbalenya, A.; Schirrmeyer, H.; Behrens, S.; Letzel, T. and Mundt, E. 2004.** VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 85:2221-2229.
89. **Xue, C. and Lim, B. 2001.** In situ localization of infectious bursal disease virus-binding cells by biotin-streptavidin system. *Avian Dis.* 45:504-511.
90. **Yamaguchi, T.; Kondo, T.; Inoshima, Y.; Ogawa, M.; Miyoshi, M. Yanai, T.; Masegi, T.; Fukushi, H. and Hirai, K. 1996.** In vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: Some characteristics of attenuated strains. *Avian Dis.* 40:501-509.
91. **Zorman-Rojs, O.; Barlic-Maganja, D.; Mitevski, D.; Lübke, W. and Mundt, E. 2003.** Very virulent infectious bursal disease virus in southeastern Europe. *Avian Dis.* 47:186-192.

APÉNDICE

	Pág.
Apéndice 1. Calendario de actividades durante la crianza.	61
Apéndice 2. Hoja de cálculo para la formula Deventer (Intervet, 2004) Microsoft62 Excel for Windows 2003	62
Apéndice 3. Número de días a esperar entre el título medido en un pollo de engorde (ELISA IDEXX) y el título rompe barrera materna de la vacuna IBD	63
Apéndice 4. Número de días a esperar entre el título medido en una ponedora (ELISA IDEXX) y el título rompe barrera materna de la vacuna IBD (intermedia e intermedia plus), de acuerdo con la fórmula Deventer.....	64
Apéndice 5. Número de días extra de espera (pollo de engorde, reproductoras y ponedoras) antes de la vacunación, cuando la toma de muestras de sangre se hace en los días 0- 4 de edad, usando la fórmula Deventer.....	65
Apéndice 6. Grados de diarrea según severidad	66

Apéndice 7. Porcentajes de aves con diarrea según grado de severidad.....	67
Apéndice 8. Lesiones macroscópicas en bursa a los 35 días de edad previo al desafío	68
Apéndice 9. Lesiones macroscópicas en bursa 4 días post desafío	69
Apéndice 10. Lesiones macroscópicas en bursa 7 días post desafío	70
Apéndice 11. Lesiones macroscópicas en bursa 10 días post desafío	71
Apéndice 12. Calificación de lesiones histopatológicas en bursa de aves desafiadas con la cepa F 52/70	72
Apéndice 13. Descripción de lesiones microscópicas en bursa a los 35 días de edad previo al desafío.....	73
Apéndice 14. Descripción de lesiones microscópicas en bursa a los 4 días post desafío.....	75
Apéndice 15. Descripción de lesiones microscópicas en bursa a los 7 días post desafío.....	77
Apéndice 16. Descripción de lesiones microscópicas en bursa a los 10 días post desafío.....	79

Apéndice 1. Calendario de actividades durante la crianza

[illegible]

Apéndice 2. Hoja de cálculo para la formula Deventer (Intervet, 2004)
Microsoft Excel for Windows 2003

Cálculo de edad de vacunación = 21 días

Muestra Nº	Título Idexx				Edad de muestreo:	1	días	
1	4130							
2	4421				<i>Edad óptima de vacunación para el</i>	75%	<i>de la población</i>	
3	4593				<i>Cepa vacunal:</i>	Otras	228TC	228E
4	4702				<i>Título Rompebarrera, Idexx, Biochek</i>	100	125	500
5	5633			<i>T_{1/2} (days):</i>				
6	5687			3.0	Broiler	23	21	16
7	6127			4.5	Broiler Breeder	32	31	22
8	6388			5.5	Layer	38	37	26
9	6584							
10	6840				<i>Edad óptima de vacunación para el</i>	25%	<i>de la población</i>	
11	7218				<i>Cepa vacunal:</i>	Otras	228TC	228E
12	7292				<i>Título Rompebarrera, Idexx, Biochek</i>	100	125	500
13	7711			<i>T_{1/2} (days):</i>				
14	7891			3.0	Broiler	21	20	14
15	8073			4.5	Broiler Breeder	29	28	19
16	8073			5.5	Layer	35	33	22
17	8101							
18	8148				<i>Gap between take day of lowest 25% of the flock, & 75% take vaccination day:</i>			
GMT	6534					Days		
CV	21%				Broiler	2		
					Broiler Breeder	3		
					Layer	4		

Apéndice 3. Número de días a esperar entre el título medido en un pollo de engorde (ELISA IDEXX) y el título rompe barrera materna de la vacuna IBD

DÍAS A ESPERAR	TÍTULO DE POLLO DE ENGORDE, T1/2= 3 DÍAS, TÍTULO ROMPE BARRERA = 500	TÍTULO DE POLLO DE ENGORDE, T1/2= 3 DÍAS, TÍTULO ROMPE BARRERA = 125
3	1024	256
4	1290	322
5	1629	407
6	2048	512
7	2580	645
8	3258	815
9	4096	1024
10	5159	1290
11	6502	1629
12	8192	2048
13	10319	2580
14		3258
15		4096
16		5159
17		6502
18		8192
19		10319

(De Witt, 2001)

Apéndice 4. Número de días a esperar entre el título medido en una ponedora (ELISA IDEXX) y el título rompe barrera materna de la vacuna IBD (intermedia e intermedia plus), de acuerdo con la fórmula Deventer.

DÍAS A ESPERAR	TÍTULO DE PONEDORA, T1/2= 5.5 DÍAS, TÍTULO ROMPE BARRERA = 500	TÍTULO DE PONEDORA, T1/2= 5.5 DÍAS, TÍTULO ROMPE BARRERA = 125
5	1024	256
6	1160	294
7	1314	329
8	1499	372
9	1698	423
10	1924	481
11	2180	545
12	2469	617
13	2798	699
14	3169	798
15	3591	904
16	4096	1024
17	4640	1160
18	5257	1314
19	5997	1499
20	6794	1698
21	7697	1924
22	8719	2180
23	9878	2469
24	11191	2798
25	12678	3169
26	14362	3591
27	16384	4096
28		4640
29		5257
30		5997
31		6794
32		7697

(De Witt, 2001)

Apéndice 5. Número de días extra de espera (pollo de engorde, reproductoras y ponedoras) antes de la vacunación, cuando la toma de muestras de sangre se hace en los días 0- 4 de edad, usando la fórmula Deventer.

Edad de toma de muestras	Días extra de espera
0	4
1	3
2	2
3	1
4 días o mayores	0

De Witt, 2001)

Apéndice 6. Grados de diarrea según severidad



Fig 6.1 Grado 0 (Sin diarrea)



Fig 6.2 Grado 1 (Leve)



Fig 6.3 Grado 2 (Moderado)



Fig 6.4 Grado 3 (Severo)

**Apéndice 7. Porcentajes de aves con diarrea
según grado de severidad**

3 días post desafío				
Grupo	Grado de Diarrea			
	0	1	2	3
A	26.7	40.00	24.4	8.9
B	17.8	37.8	35.5	8.9
C	11.1	31.1	31.1	26.7

4 días post desafío				
Grupo	Grado de Diarrea			
	0	1	2	3
A	15.6	46.7	24.4	13.3
B	11.1	44.5	31.1	13.3
C	2.2	40.0	40.0	17.8

5 días post desafío				
Grupo	Grado de Diarrea			
	0	1	2	3
A	16.7	46.7	23.3	13.3
B	16.7	46.7	20.00	16.7
C	3.3	46.7	30.0	20.0

7 días post desafío				
Grupo	Grado de Diarrea			
	0	1	2	3
A	6.7	33.3	33.3	26.7
B	20.0	46.7	33.3	0.00
C	0.0	26.7	40.0	33.3

10 días post desafío				
Grupo	Grado de Diarrea			
	0	1	2	3
A	26.7	46.7	20.00	6.6
B	7.1	21.4	57.2	14.3
C	6.7	33.3	60.0	0.0

**Apéndice 8. Lesiones macroscópicas en bursa
a los 35 días de edad previo al desafío**



Fig 7.1 Bursas de apariencia normal a los 35 días de edad (previo al desafío).
Nótese la ausencia de lesiones (edema y/o hemorragias)

Apéndice 9. Lesiones macroscópicas en bursa 4 días post desafío



Fig 9.1 Bursas de apariencia normal



Fig 9.2 Bursas de apariencia normal



Fig 9.1 Bursas con edema 6,14,15

Apéndice 10. Lesiones macroscópicas en bursa 7 días post desafío



Fig 10.1 Bursas con edema
2,3,6,7,8,9,10,11,13



Fig 10.1 Bursas con edema 2,5



Fig 10.1 Bursas con edema
1,3,4,9,10,12,13,15

Apéndice 11. Lesiones macroscópicas en bursa 10 días post desafío



Fig 11.1 Bursas con edema
2,4,5,6,9,10,12,13,14,15



Fig 10.1 Bursas con edema
1,2,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14



Fig 10.1 Bursas con edema
1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15

**Apéndice 12. Calificación de lesiones histopatológicas en bursa
de aves desafiadas con la cepa F 52/70**

Edad	Grupo	Calificación (5 cortes/lamina)					Promedio
35 días	A	1	2	2	2	2	1.8
	B	2	2	2	2	2	2.0
	C	2	2	2	2	2	2.0
39 días	A	3	3	3	3	3	3.0
	B	3	3	3	3	3	3.0
	C	2	2	2	3	5	2.8
42 días	A	4	4	4	4	4	4.0
	B	3	3	3	3	4	3.2
	C	3	4	4	5	5	4.2
45 días	A	3	3	3	4	4	3.4
	B	2	3	3	4	4	3.2
	C	3	4	4	5	5	4.2
45 días SD	A	2	2	2	2	2	2.0
	B	2	2	2	2	2	2.0
	C	2	2	3	3	3	2.6

SD= Sin desafío

0: Sin lesión

1: Leve necrosis folicular

2: Moderada depleción linfoide folicular o severa depleción de algunos folículos

3: Severa depleción linfoide en más del 50% de folículos

4: Pérdida de arquitectura tisular del folículo con incremento de tejido conectivo

Linfocitos escasos + quistes + hiperplasia epitelial

5: Pérdida total de folículos y fibroplasia

(Bautista *et al.*, 2003)

**Apéndice 13. Descripción de lesiones microscópicas
en bursa a los 35 días de edad previo al desafío**

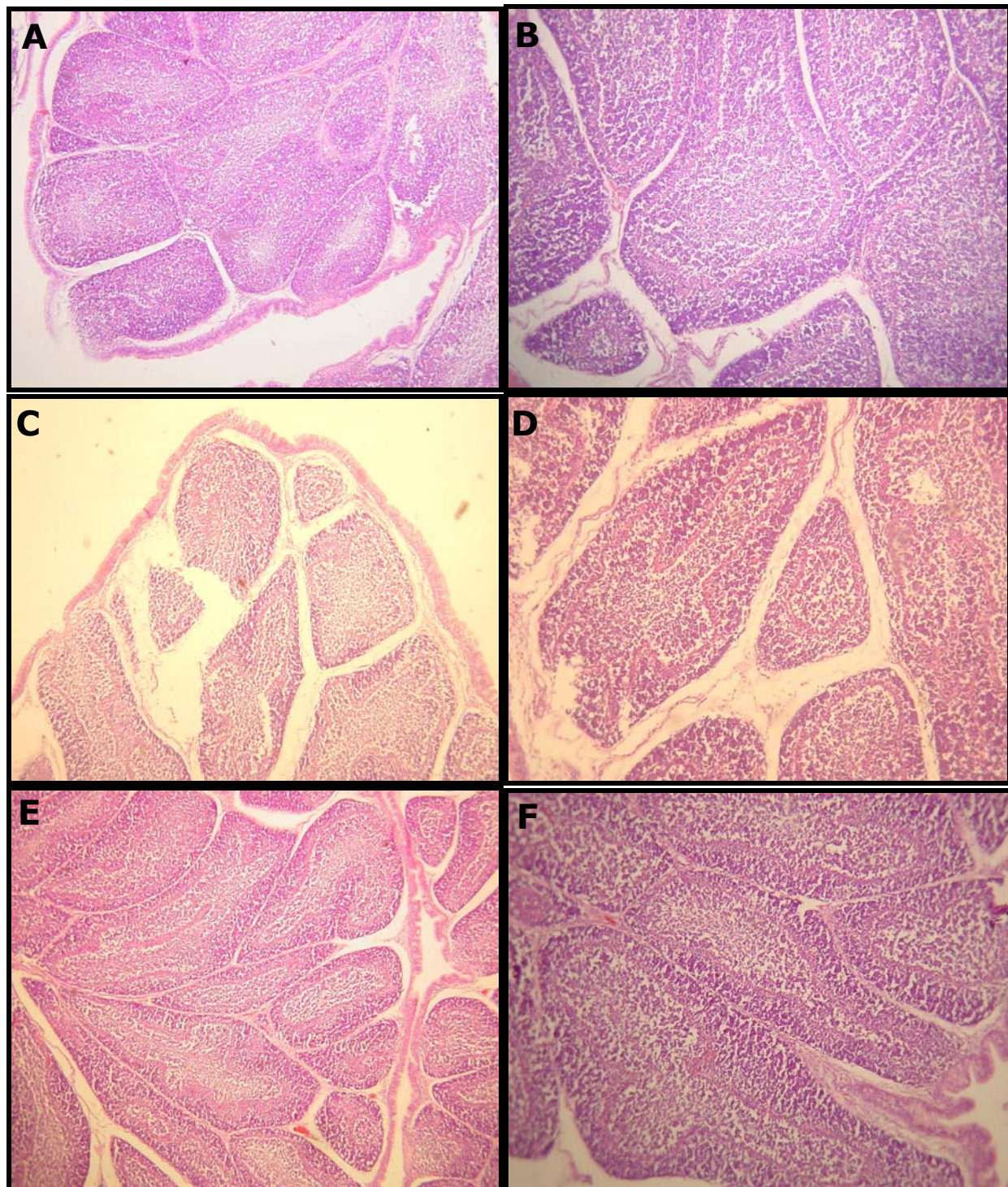


Fig. 13A (5x)

Grupo A. Moderada depleción de linfocitos en la zona medular del folículo y leve depleción a nivel cortical. Se puede diferenciar la médula de la corteza del folículo.

Fig. 13B (10x)

Grupo A. Ligero incremento en el espacio interfolicular (edema). Moderada depleción de linfocitos a nivel medular.

Fig. 13C (5x)

Grupo B. Moderada depleción de linfocitos en la zona medular del folículo y leve depleción a nivel cortical. Se puede diferenciar la médula de la corteza del folículo. Ligero incremento en el espacio interfolicular (edema). Leve infiltración de fibras de tejido conjuntivo interfolicular.

Fig. 13D (10x)

Grupo B (Aumento)

Fig. 13E (5x)

Grupo C. Moderada depleción de linfocitos en la zona medular del folículo y leve depleción a nivel cortical. Se puede diferenciar la médula de la corteza del folículo. Ligero incremento en el espacio interfolicular (edema). Leve infiltración de fibras de tejido conjuntivo interfolicular. Hiperplasia epitelial leve

Fig. 13F (10x)

Grupo C (Aumento)

**Apéndice 14. Descripción de lesiones microscópicas
en bursa a los 4 días post desafío**

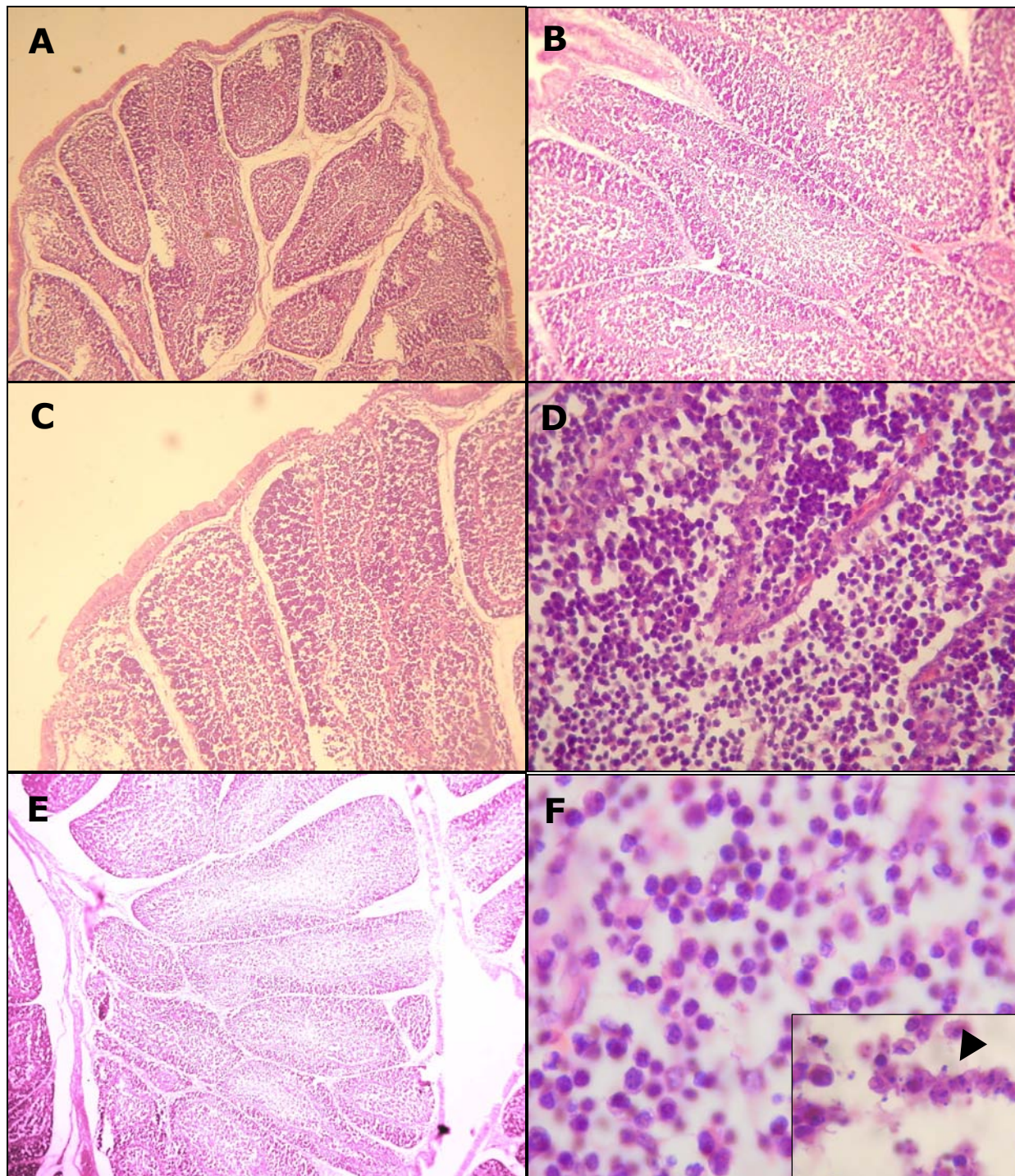


Fig. 14A (5x)

Grupo A. Moderada depleción de linfocitos a nivel cortical y medular. Algunos folículos presentan severa depleción. Hiperplasia epitelial en algunas plicas. El espacio interfolicular es mucho más notorio y hay infiltración de fibras de tejido conectivo.

Fig. 14B (10x)

Grupo A. Aumento

Fig. 14C (10x)

Grupo B. Moderada depleción de linfocitos a nivel cortical y medular. Algunos folículos presentan severa depleción. Hiperplasia epitelial en algunas plicas. El espacio interfolicular es mucho más notorio y hay infiltración de fibras de tejido conectivo.

Fig. 14D (40x)

Grupo B. Se aprecia una disminución considerable de linfocitos. Red capilar entre médula y corteza. Sin daño aparente.

Fig. 14E (5x)

Grupo C. Severa depleción de linfocitos con pérdida parcial de la zona corticomedular, en algunos folículos no se llega a diferenciar. Infiltración de tejido conjuntivo. Escasos microquistes en el epitelio de las plicas.

Fig. 14F (100x)

Grupo C. Linfocitolisis.

**Apéndice 15. Descripción de lesiones microscópicas
en bursa a los 7 días post desafío**

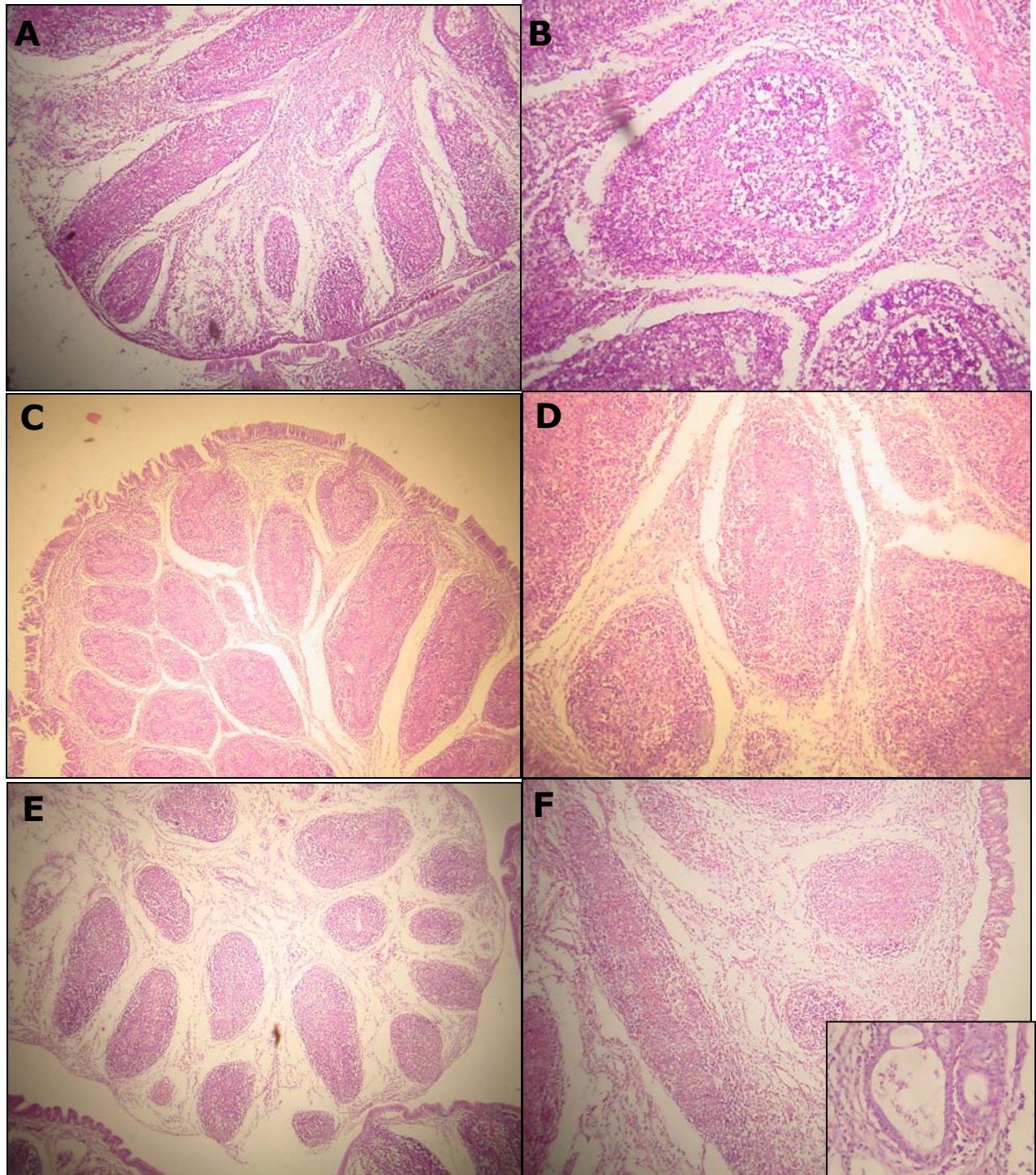


Fig. 15A (5x)

Grupo A. Severa depleción linfóide. Pérdida de folículos y proliferación de abundante tejido conjuntivo (fibroplasia moderada). No se diferencia entre corteza y médula. Algunos folículos se han perdido.

Fig. 15B (10x)

Grupo A. Severa depleción linfóide y severa fibroplasia. Contracción del folículo

Fig. 15C (5x)

Grupo B. Severa depleción linfóide. Pérdida de la arquitectura tisular del folículo pero se logra diferenciar entre corteza y médula. Algunos folículos se han perdido. Fibroplasia moderada. Hiperplasia epitelial moderada.

Fig. 15D (10x)

Grupo B. Aumento

Fig. 15E (5x)

Grupo C. Severa depleción linfóide. Pérdida de la arquitectura tisular del folículo no se logra diferenciar entre corteza y médula. Folículos contraídos y abundante espacio interfolicular con fibroplasia moderada. Invaginación del epitelio con hiperplasia epitelial.

Fig. 15F (10x)

Grupo C. Pérdida de folículo y presencia de quistes en proceso de formación. Hiperplasia epitelial.

**Apéndice 16. Descripción de lesiones microscópicas
en bursa a los 10 días post desafío**

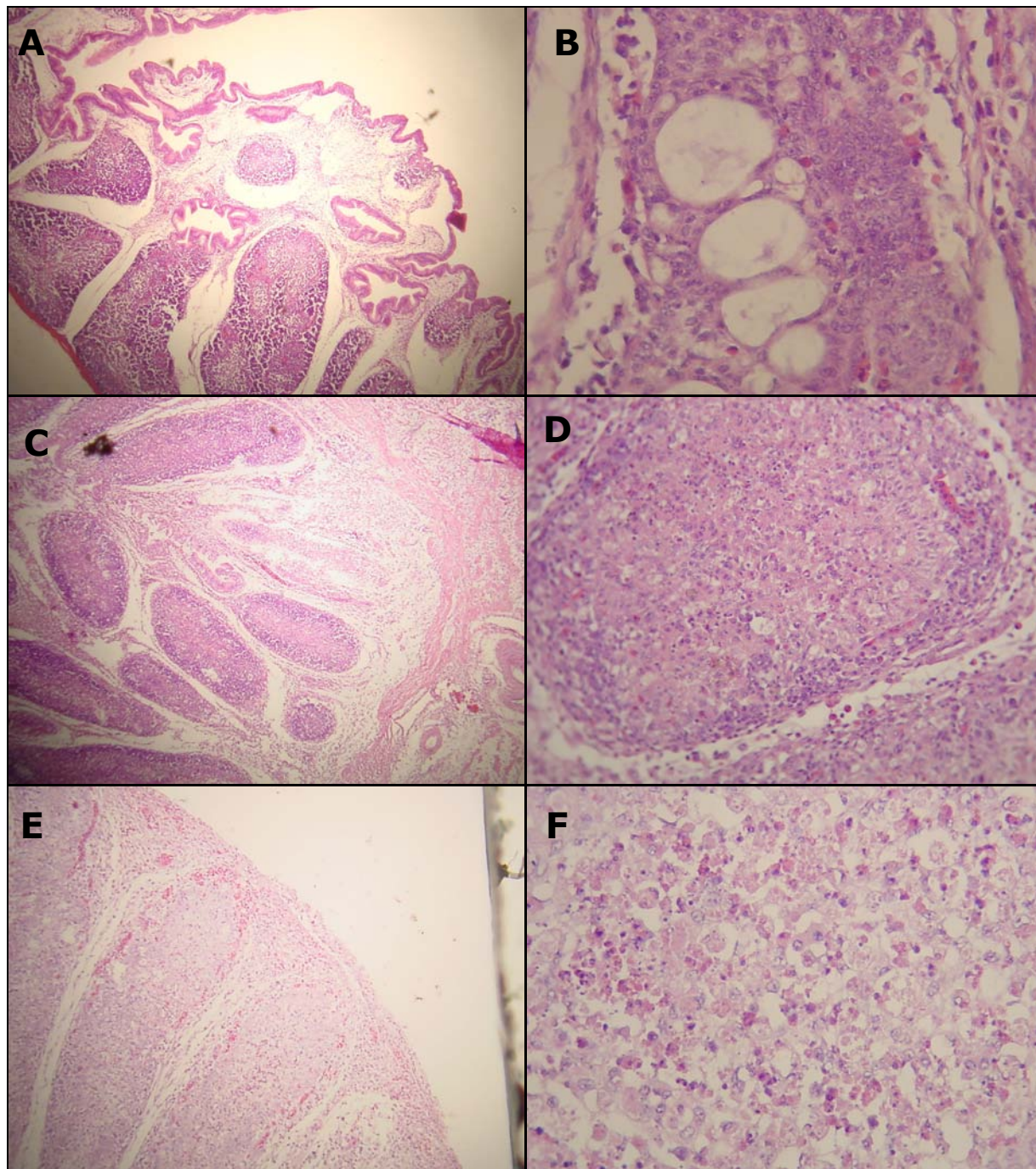


Fig. 16A (5x)

Grupo A. Severa hiperplasia epitelial e invaginación del epitelio. Quistes

Fig. 16B (40x)

Grupo A. Quistes y proliferación de tejido conjuntivo.

Fig. 16C (5x)

Grupo B. Severa depleción linfoide. Hiperplasia epitelial y abundante proliferación de tejido conjuntivo. Nótese la ausencia de folículos

Fig. 16D (40x)

Grupo B. Folículo atrófico.

Fig. 16E (10x)

Grupo C. Pérdida de epitelio de revestimiento. Folículos atróficos

Fig. 16F (40x)

Grupo C. Pérdida de la población linfoide. Detritus celular.